

DIE ZELLULÄRE IMMUNITÄT BEI DER DILATATIVEN
KARDIOMYOPATHIE IM VERGLEICH ZU NORMAL-
PERSONEN - EINE LYMPHOZYTENKINETISCHE
UNTERSUCHUNG

RICHARD MÜLLER

1985

*des
München*

Aus der Medizinischen Klinik III
Klinikum Großhadern
Direktor: Professor Dr. W. Wilmanns

DIE ZELLULÄRE IMMUNITÄT BEI DER DILATATIVEN KARDIOMYOPATHIE
IM VERGLEICH ZU NORMALPERSONEN - EINE LYMPHOZYTENKINETISCHE
UNTERSUCHUNG

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Richard Müller
aus
Geretsried
1985

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität
München

Berichterstatter:	Professor Dr. W. Mempel
Mitberichterstatter:	Professor Dr. W. Wilmanns
Dekan:	Professor Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 3.6.1986

1. 1. 1957

2. 1. 1957

3. 1. 1957

4. 1. 1957

5. 1. 1957

6. 1. 1957

7. 1. 1957

8. 1. 1957

9. 1. 1957

10. 1. 1957

11. 1. 1957

12. 1. 1957

13. 1. 1957

14. 1. 1957

15. 1. 1957

16. 1. 1957

17. 1. 1957

18. 1. 1957

19. 1. 1957

20. 1. 1957

21. 1. 1957

22. 1. 1957

23. 1. 1957

24. 1. 1957

25. 1. 1957

26. 1. 1957

27. 1. 1957

28. 1. 1957

29. 1. 1957

30. 1. 1957

31. 1. 1957

32. 1. 1957

33. 1. 1957

34. 1. 1957

35. 1. 1957

36. 1. 1957

37. 1. 1957

38. 1. 1957

39. 1. 1957

40. 1. 1957

41. 1. 1957

42. 1. 1957

43. 1. 1957

44. 1. 1957

45. 1. 1957

46. 1. 1957

47. 1. 1957

48. 1. 1957

49. 1. 1957

50. 1. 1957

51. 1. 1957

52. 1. 1957

53. 1. 1957

54. 1. 1957

55. 1. 1957

56. 1. 1957

57. 1. 1957

58. 1. 1957

59. 1. 1957

60. 1. 1957

61. 1. 1957

62. 1. 1957

63. 1. 1957

64. 1. 1957

65. 1. 1957

66. 1. 1957

67. 1. 1957

68. 1. 1957

69. 1. 1957

70. 1. 1957

71. 1. 1957

72. 1. 1957

73. 1. 1957

74. 1. 1957

75. 1. 1957

76. 1. 1957

77. 1. 1957

78. 1. 1957

79. 1. 1957

80. 1. 1957

81. 1. 1957

82. 1. 1957

83. 1. 1957

84. 1. 1957

85. 1. 1957

86. 1. 1957

87. 1. 1957

88. 1. 1957

89. 1. 1957

90. 1. 1957

91. 1. 1957

92. 1. 1957

93. 1. 1957

94. 1. 1957

95. 1. 1957

96. 1. 1957

97. 1. 1957

98. 1. 1957

99. 1. 1957

100. 1. 1957

MEINEN ELTERN

IN DANKBARKEIT GEWIDMET

1. 1. 1957

2. 1. 1957

3. 1. 1957

4. 1. 1957

5. 1. 1957

6. 1. 1957

7. 1. 1957

8. 1. 1957

9. 1. 1957

10. 1. 1957

11. 1. 1957

12. 1. 1957

13. 1. 1957

14. 1. 1957

15. 1. 1957

16. 1. 1957

17. 1. 1957

18. 1. 1957

19. 1. 1957

20. 1. 1957

21. 1. 1957

22. 1. 1957

23. 1. 1957

24. 1. 1957

25. 1. 1957

26. 1. 1957

27. 1. 1957

28. 1. 1957

29. 1. 1957

30. 1. 1957

31. 1. 1957

32. 1. 1957

33. 1. 1957

34. 1. 1957

35. 1. 1957

36. 1. 1957

37. 1. 1957

38. 1. 1957

39. 1. 1957

40. 1. 1957

41. 1. 1957

42. 1. 1957

43. 1. 1957

44. 1. 1957

45. 1. 1957

46. 1. 1957

47. 1. 1957

48. 1. 1957

49. 1. 1957

50. 1. 1957

51. 1. 1957

52. 1. 1957

53. 1. 1957

54. 1. 1957

55. 1. 1957

56. 1. 1957

57. 1. 1957

58. 1. 1957

59. 1. 1957

60. 1. 1957

61. 1. 1957

62. 1. 1957

63. 1. 1957

64. 1. 1957

65. 1. 1957

66. 1. 1957

67. 1. 1957

68. 1. 1957

69. 1. 1957

70. 1. 1957

71. 1. 1957

72. 1. 1957

73. 1. 1957

74. 1. 1957

75. 1. 1957

76. 1. 1957

77. 1. 1957

78. 1. 1957

79. 1. 1957

80. 1. 1957

81. 1. 1957

82. 1. 1957

83. 1. 1957

84. 1. 1957

85. 1. 1957

86. 1. 1957

87. 1. 1957

88. 1. 1957

89. 1. 1957

90. 1. 1957

91. 1. 1957

92. 1. 1957

93. 1. 1957

94. 1. 1957

95. 1. 1957

96. 1. 1957

97. 1. 1957

98. 1. 1957

99. 1. 1957

100. 1. 1957

TEIL I: KONVENTIONELLE MATHEMATISCHEN ANALYSEN

1. EINLEITUNG

- 1.1. Allgemeines
- 1.2. Die Lymphozyten
 - 1.2.1. B-Lymphozyten
 - 1.2.2. T-Lymphozyten
 - 1.2.2.1. T-Helferzellen
 - 1.2.2.2. T-Suppressorzellen
 - 1.2.2.3. T-Killerzellen
 - 1.2.3. Nullzellen
- 1.3. Der Ablauf von Immunreaktionen
- 1.4. Ziele der Untersuchung

2. MATERIAL UND METHODEN

- 2.1. Probanden
 - 2.1.1. Dilatative Kardiomyopathie
 - 2.1.2. Kontrollen
- 2.2. Untersuchungen
 - 2.2.1. Mitogen- und Antigenstimulation
 - 2.2.1.1. Mitogene
 - 2.2.1.2. Antigene
 - 2.2.2. Suppressorzellassay
 - 2.2.3. T-Zellsubpopulationen
- 2.3. Statistische Analysen

3. ERGEBNISTEIL 1

- 3.1. Mitogen- und Antigenstimulation
 - 3.1.1. Mitogene
 - 3.1.2. Antigene
- 3.2. Suppressorzellassay
- 3.3. T-Zellsubfraktionen
- 3.4. Diskussion Ergebnisteil 1

TEIL II: CLUSTERANALYSE

4. ERGEBNISTEIL 2 - CLUSTERANALYSE

- 4.1. Statistische Methoden
- 4.2. Kontrollen
 - 4.2.1. Ergebnisse
 - 4.2.2. Diskussion
- 4.3. Dilatative Kardiomyopathie
 - 4.3.1. Ergebnisse
 - 4.3.1.1. Mitogen- und Antigenstimulation
 - 4.3.1.2. Suppressorzellaktivität
 - 4.3.1.3. T-Zellsubfraktionen
 - 4.3.2. Diskussion

5. ZUSAMMENFASSENDE DISKUSSION DER ERGEBNISTEILE 1 UND 2

6. IMMUNGENETISCHER ANHANG

- 6.1. Einleitung
 - 6.1.1. Allgemeines
 - 6.1.2. Ir-Gene
 - 6.1.3. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)
 - 6.1.4. Das HLA-System
 - 6.1.4.1. Klasse-I-Antigene
 - 6.1.4.2. Klasse-II-Antigene
 - 6.1.5. Fragestellung
- 6.2. Mathematische Methoden
- 6.3. Ergebnisse
 - 6.3.1. Kontrollkollektiv
 - 6.3.2. Cluster
 - 6.3.2.1. Cluster 1 (Mittelhochreagenten)
 - 6.3.2.2. Cluster 2 (Niedrigreagenten)
 - 6.3.2.3. Cluster 3 (Hochreagenten)
 - 6.3.3. Dilatative Kardiomyopathie

6.4. Diskussion

7. ZUSAMMENFASSUNG

8. LITERATURVERZEICHNIS

TEIL I: KONVENTIONELLE MATHEMATISCHE ANALYSEN

1. Einleitung

1.1. Allgemeines

In der Auseinandersetzung eines Individuums mit seiner Umwelt kommt dem Immunsystem eine besondere Bedeutung zu. Seine ungestörte Funktion ist die Voraussetzung für das Überleben des Gesamtorganismus nach einer Infektion durch pathogene Stoffe oder Mikroorganismen.

Der Begriff "Immunität" hat in der Medizin im Laufe der Zeit einen Bedeutungswandel erfahren. Bezeichnete man früher damit einen von jeder Ansteckung freien Zustand des Organismus, so versteht man heute unter Immunität den erfolgreichen Einsatz der körpereigenen Abwehrmechanismen als Antwort auf die ständig eindringenden pathogenen Erreger oder Toxine. Zur Sicherung dieses Gleichgewichtszustandes zwischen dem Organismus und seiner Umwelt steht dem Körper ein komplexes System von Mechanismen zur Verfügung. Diese Mechanismen sind teils angeborene, also bei Geburt bereits funktionsfähig, teils werden sie im Laufe des Lebens erworben. Während die erworbenen Abwehrmechanismen nach Kontakt des Immunsystems mit antigenen Strukturen zu einer spezifisch gegen das sie induzierende Antigen gerichteten Reaktion fähig sind, wirken die angeborenen Mechanismen gegen eine Vielzahl körperfremder Agentien. Abwehrmechanismen können an die unmittelbare Anwesenheit von Zellen gebunden, das heißt zellulärer Natur sein oder durch die Wirkung löslicher Substanzen zustande kommen, also humoraler Art sein (64, 87, 97).

Als Beispiele für unspezifische humorale Abwehrmechanismen seien Lysozym, Properdin, Interferon und die Isoagglutinine genannt (1, 68, 112, 141, 152, 164, 169, 203).

Zellulärer Natur sind unter anderem unspezifische Abwehrvorgänge, an denen Makrophagen und Granulozyten beteiligt sind (136, 165, 168, 208).

Unspezifische Schutzmechanismen sind zum Teil als Frühform

bereits bei Einzellern nachweisbar und stellen wahrscheinlich bis zur Stufe der Wirbellosen die einzige Möglichkeit der Infektionsabwehr dar (30, 183). Bei den Wirbeltieren wird das Immunsystem durch die spezifischen Abwehrmechanismen ergänzt. Gegen körperfremde Antigene können spezifische humorale oder zelluläre Reaktionen in Gang gesetzt werden (12, 31, 83, 183). Für diese Immunreaktion sind spezialisierte lymphoide Zellen zuständig, die zudem als wesentliche Weiterentwicklung eine Gedächtnisfunktion erfüllen können. Dadurch erfolgt nach erneutem Kontakt mit dem spezifischen Antigen eine schnellere und stärkere Immunantwort (12, 31, 83, 145, 183).

Genetische Faktoren haben wesentlichen Einfluß auf die Reaktion des Immunsystems (33, 71, 97). Darin findet sowohl die Beobachtung ihre Erklärung, daß verschiedene Spezies eine unterschiedliche Resistenz gegenüber bestimmten Erregern besitzen, als auch das Phänomen, daß innerhalb einer Art die Reaktionsfähigkeit gegen ein und denselben Erreger zwischen verschiedenen Rassen deutlich variieren kann. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die Tuberkulose, an der Neger und Indianer häufiger erkranken als weiße Europäer (71, 97, 116).

1.2. Die Lymphozyten

Träger der spezifischen Immunabwehr sind die Lymphozyten (55). Ihr Anteil an den im peripheren Blut zirkulierenden Leukozyten beträgt beim gesunden Erwachsenen 25 bis 40 %, also 1000 bis 3600 Lymphozyten pro Mikroliter Blut. Im Kreislauf befinden sich nur ca. 4 % der im Gesamtorganismus vorhandenen Lymphozyten. Der überwiegende Anteil dieser Zellen ist in den lymphatischen Organen, unter anderem in Milz, Tonsillen, Lymphknoten und im Knochenmark sowie in anderen Geweben lokalisiert (55).

Wie alle Blutzellen entwickeln sich auch die Lymphozyten aus den Blutstammzellen im Knochenmark. Von dort aus erreichen die immunologisch noch inkompetenten Zellen die Orte ihrer weiteren Differenzierung (94, 113).

Lichtmikroskopisch erscheinen die Lymphozyten in der panoptischen Färbung nach Pappenheim (143) wie die Monozyten als mononukleäre Zellen. Aufgrund des Zelldurchmessers unterscheidet man kleine und große Lymphozyten. Den Hauptanteil bilden mit einem Durchmesser von etwa 10 μm die kleinen Lymphozyten. Ihr homogener dunkelblau gefärbter, scharf begrenzter Kern ist von einem schmalen, mittelblau gefärbten Zytoplasmasaum umgeben. Bei den großen Lymphozyten (Durchmesser 10 bis 25 μm) ist vor allem das Volumen des Zytoplasmas erhöht. Der Kern wirkt weniger homogen und kann eingedellt oder bohnenförmig sein. 10 bis 20 % der Lymphozyten im peripheren Blut, meist große Zellen, besitzen eine rötlich-violette Granulation im Zytoplasma. Ebenso wie diese großen, granulierten Lymphozyten (LGL) sind auch atypische Lymphozyten, sogenannte Reizformen, bei Infektionen vermehrt im Blutaussstrich zu finden (9, 41, 174, 207).

Der überwiegende Teil der Lymphozyten weist eine lange Lebensdauer von einigen hundert Tagen bis zu Jahrzehnten auf. Nur etwa 10 % der lymphatischen Zellen werden mit einer Lebenszeit von 1 bis 12 Tagen als kurzlebig bezeichnet (9, 55, 187).

Weitere, an den unterschiedlichen Funktionen der Lymphozyten im Immunsystem orientierte Untersuchungen führten zur Einteilung in B- (Bursa fabricii oder Bone marrow) und T- (Thymus-abhängige)-Lymphozyten (74, 115).

1.2.1. B-Lymphozyten

Ein Teil der lymphatischen Vorläuferzellen gelangt bei Vögeln in die Bursa fabricii, ein lymphoepitheliales Organ im Enddarm, wo ihre weitere Differenzierung zu immunkompetenten Zellen stattfindet. Beim Menschen, bei dem ein ver-

gleichbares Organ nicht vorhanden ist, entstehen die B-Zellen wahrscheinlich im Knochenmark (70, 89, 99, 196). Ihr Anteil an der Gesamtlymphozytenzahl beträgt beim gesunden Erwachsenen 22 bis 36 % (9).

Auf ihrer Oberfläche tragen diese Zellen Immunglobuline, häufig IgM und IgD, seltener auch IgG. Die Bedeutung dieser zellständigen Immunglobuline ist, ebenso wie die von Fc- und Komplementrezeptoren auf der Oberfläche von B-Lymphozyten, noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise spielen sie eine Rolle bei der Antigenerkennung und Triggerung von Immunreaktionen (9, 144, 150, 198, 199).

Die meisten B-Zellen gehören mit einer Lebensspanne von wenigen Tagen bis Monaten in die Gruppe der kurzlebigen Zellen (187).

Im elektronenmikroskopischen Bild verleiht eine Vielzahl von Mikrovilli den B-Zellen ein stacheliges Aussehen (114, 155). Nach Kontakt mit dem spezifischen Antigen proliferieren die B-Lymphozyten zu großen, teilungsfähigen Blasten, aus denen sich sowohl Gedächtniszellen (memory cells) als auch Immunglobulin produzierende Plasmazellen bilden können. Daraus geht hervor, daß die Aufgabe der B-Zellen in der Durchführung der spezifischen humoralen Immunantwort besteht (9, 115).

1.2.2. T-Lymphozyten

Eine andere Population von lymphatischen Zellen erhält ihre Prägung im Thymus, einem Organ entodermaler Herkunft. Mit zunehmendem Lebensalter des Individuums wird das Thymusparenchym nach und nach durch Fettgewebe ersetzt, sodaß der Nachschub an reifen T-Zellen abnimmt (142, 173). Eine durch ihre Membraneigenschaften bedingte Eigenschaft der T-Zellen ist die Fähigkeit, mit Schaferythrozyten Rosetten zu bilden (56). Unter Ausnutzung dieses Phänomens gelang es erstmals, die lichtmikroskopisch homogen erscheinende Lymphozytenpopulation zu fraktionieren. 37 bis 74 % aller

Lymphozyten im peripheren Blut , das sind 420 bis 3000 Zellen pro Mikroliter, konnten so als T-Zellen identifiziert werden (9). Im Elektronenmikroskop unterscheiden sich die T-Lymphozyten von den B-Zellen durch ihre relativ glatte Oberfläche (114, 155).

Lichtmikroskopisch sind die beiden Populationen nicht zu differenzieren. T-Lymphozyten sind meist klein mit Durchmessern um 10 μm und in der Mehrzahl langlebig. Im Laufe ihres Lebens, das Jahre bis Jahrzehnte dauern kann, wandern sie mehrmals zwischen Blut- und Lymphsystem hin und her (9, 156).

Der Kontakt mit einem spezifischen Antigen stimuliert die T-Zellen zur Umwandlung in T-Lymphoblasten, deren Aufgabe die Produktion und Freisetzung einer Reihe von hochwirksamen Substanzen, der Lymphokine, ist (42, 206). Diese Substanzen spielen eine wesentliche Rolle beim Zusammenwirken verschiedener Zellpopulationen im Rahmen von Immunreaktionen wie etwa der Abstoßung von transplantiertem Fremdgewebe (15).

Ähnlich wie im B-Zellsystem entsteht bei der Aktivierung von T-Lymphozyten ein immunologisches Gedächtnis in Form von Memory-Zellen, welche die Information über ein bestimmtes Antigen über lange Zeiträume speichern können und bei erneutem Kontakt mit diesem Antigen eine rasche, verstärkte Reaktion einleiten (10, 175).

Aufgrund funktioneller Untersuchungen erhielt man bald Hinweise auf die Existenz unterschiedlicher Subpopulationen der T-Lymphozyten, deren Differenzierung wahrscheinlich nach einem genetisch festgelegten Muster erfolgt (10, 26, 175, 180, 188).

1.2.2.1. T-Helferzellen

Die Aktivierung von T-Helferzellen im Rahmen einer Immunantwort gegen ein Antigen geschieht unter der Mitwirkung von Makrophagen. Sie führt zur Freisetzung von Lymphokinen, die

weitere Makrophagen anlocken, sowie eine klonale Proliferation von B-Lymphozyten und deren Umwandlung in Plasmazellen bewirken. Damit wird die humorale Abwehrreaktion gegen sogenannte thymusabhängige Antigene eingeleitet (66, 69, 154, 190, 202). Auch die Differenzierung von T-Lymphozyten zu T-Killerzellen wird von T-Helferzellen durch das Interleukin 2, ein hochwirksames Mitogen, gefördert (185).

T-Helferzellen spielen somit bei der Induktion und Regulation von Immunreaktionen eine wichtige Rolle.

1.2.2.2. T-Suppressorzellen

Gegenspieler der T-Helferzellen im Immunsystem sind die T-Suppressorzellen. Sie kontrollieren über freigesetzte Lymphokine praktisch alle an den Immunreaktionen beteiligten Zellpopulationen und gewährleisten so einen adäquaten Einsatz der verschiedenen Abwehrmechanismen. Dazu gehört neben der Regulation der Antikörpersynthese durch aktivierte B-Lymphozyten unter anderem auch die Entwicklung einer Immuntoleranz gegen körpereigene und in der Nahrung enthaltene Antigene (117, 129).

Die ungestörte Funktion der Suppressorzellen ist demnach von entscheidender Bedeutung für eine hinsichtlich ihrer Stärke, Dauer und Zielrichtung angemessene Reaktion des Immunsystems.

In vitro kann Suppressorzellaktivität durch Stimulation von T-Zellen mit Mitogenen induziert werden (43, 159, 160). Damit steht ein brauchbares Modell für die Regulation immunologischer Vorgänge im lebenden Organismus zur Verfügung.

1.2.2.3. T-Killerzellen

Die ausführenden Organe der spezifischen, zellulären Immunabwehr sind die T-Killerzellen. Sie entstehen unter der Kontrolle der beiden bereits genannten T-Zellsubpopulationen (27, 28, 185).

Die zytotoxische Aktivität der T-Killerzellen wird durch Übereinstimmung der Epitope des Antigens auf der Oberfläche der Zielzelle und gleichzeitiger Übereinstimmung der Histo-kompatibilitätsantigene von Killer- und Zielzelle ermöglicht. Diese Situation ist in der Regel bei virusinfizierten körpereigenen Zellen gegeben (10). Eine Variante dieses Angriffsmechanismus ist die Vermittlung durch spezifische, von Plasmazellen produzierte Antikörper gegen Oberflächenantigene der Zielzelle (124).

Zur Zerstörung der Zielzelle ist ein unmittelbarer Kontakt zwischen ihr und der T-Killerzelle erforderlich. Die Zytolyse wird entweder von den T-Killerzellen selbst oder von Makrophagen, die auf humoralem Wege aktiviert werden, durchgeführt (110, 176).

1.2.3. Nullzellen

Etwa 15 % der Lymphozyten im peripheren Blut besitzen keinen der für B- oder T-Zellen typischen Oberflächenmarker und werden deshalb als Nullzellen bezeichnet (9, 76). Sie können körperfremde oder veränderte Zellen ähnlich wie die T-Killerzellen zerstören. Die NK-(natural killer)-Zellen sind in der Lage, ihre Zielzellen direkt zu attackieren, während die K-(killer)-Zellen auf ihrer Oberfläche Rezeptoren für den Fc-Teil von Immunglobulin besitzen. Diese ermöglichen ihnen, sich an ihre Zielzelle anzulagern, nachdem deren Antigene mit spezifischen Antikörpern reagiert haben. Die K-Zellen sind also auf die Mitarbeit von Plasmazellen angewiesen.

Die zytotoxische Aktivität von NK- und K-Zellen scheint vor allem gegen Tumorzellen gerichtet zu sein (81, 131, 148, 151, 191).

Die wesentlichen Unterschiede zwischen den T-Killerzellen und NK- bzw. K-Zellen liegen zum einen in der Antigenspezifität der T-Killerzellen im Vergleich zur eher unspezifischen Reaktion der beiden Nullzellsubpopulationen, zum ande-

ren in der Fähigkeit der T-Killerzellen, im Gegensatz zu den den NK- und K-Zellen ein immunologisches Gedächtnis entwickeln zu können.

1.3. Der Ablauf von Immunreaktionen

Dringt ein Erreger in den Organismus ein, dann sieht er sich zunächst der Einwirkung unspezifischer humoraler Abwehrmechanismen wie Lysozym, Properdin und Komplement ausgesetzt. Bei dieser ersten Reaktion anfallende Spaltprodukte bewirken eine Aktivierung der unspezifischen zellulären Elemente des Immunsystems, also vor allem von Makrophagen und Granulozyten (64, 87, 97, 141, 169, 181, 203).

Durch die unspezifischen Abwehrmechanismen erfolgt eine Aufbereitung der Fremdantigene, so daß den Lymphozyten deren Erkennung erleichtert oder überhaupt erst ermöglicht wird (9, 64, 136, 193, 208).

Nun beginnt ein fein abgestimmtes Zusammenspiel zwischen den verschiedenen Elementen des Immunsystems. Von aktivierten Lymphozyten werden Lymphokine, hochwirksame Mediatorsubstanzen, freigesetzt, durch deren Wirkung sowohl Makrophagen und Granulozyten wie auch weitere Zellen des spezifischen Immunsystems zur Beteiligung an der Immunreaktion stimuliert werden (9, 34, 42, 64, 136, 206).

Die Reaktion der B-Lymphozyten hängt von der Art des Antigens ab. Sogenannte thymusunabhängige Antigene bringen die B-Zellen direkt zur Proliferation und zur Umwandlung in Plasmazellen. Die meisten Antigene sind thymusabhängig, das heißt, sie lösen eine spezifische humorale Reaktion der B-Zellen nur unter Mitwirkung von T-Helferzellen aus (84, 154, 189).

Es werden also in der Regel gleichzeitig zelluläre und humorale Abwehrmechanismen in Gang gesetzt. Die Interaktion zwischen den Lymphozytenpopulationen wird dabei wiederum von löslichen Mediatorsubstanzen vermittelt (32, 42, 206).

Nach der Transformation der B-Lymphozyten in Plasmazellen

beginnen diese mit der Produktion von spezifisch gegen das sie stimulierende Antigen gerichteten Antikörpern. Die Reaktion von Antigen und Antikörper leitet die letzte Phase der Immunreaktion ein. Lösliche Antigen-Antikörperkomplexe werden von Makrophagen aufgenommen und abgebaut, während Immunkomplexe auf der Oberfläche von Zellen oder Mikroorganismen deren Zerstörung durch Komplement, T-Killerzellen oder K-Zellen ermöglichen (34, 64, 97, 110, 124, 136).

B- und T-Lymphozyten entwickeln bei ihrer Beteiligung an immunologischen Prozessen ein Gedächtnis in Form von Memory-Zellen, das die Information über das auslösende Antigen speichert und bei erneutem Kontakt mit diesem Antigen eine schnellere und stärkere Abwehrreaktion auslöst, so daß es im Fall einer Neuinfektion mit dem gleichen Erreger häufig nicht mehr zu einer klinisch manifesten Erkrankung kommt (34, 64, 115).

Die Regulation der Immunreaktion wird weitgehend von zwei T-Zellsubpopulationen, den T-Helferzellen und den T-Suppressorzellen, vorgenommen. T-Helferzellen sorgen dafür, daß eine ausreichende Zahl von Zellen an der Abwehrmaßnahme teilnimmt, während ihre Gegenspieler, die Suppressorzellen, diese Vorgänge auf ein hinsichtlich ihrer Dauer und räumlichen Ausdehnung notwendiges Maß begrenzen (57, 110, 146, 161, 185).

Bei Kenntnis dieses komplexen Systems von immunologischen Regelkreisen erstaunt es nicht, daß bereits geringe Störungen dieser Funktionsabläufe zur Ursache von Erkrankungen des gesamten Organismus werden können. Ein Beispiel für die in vitro erfaßbare Veränderung immunfunktioneller Parameter finden wir beim Morbus Hodgkin. Lymphozyten von Patienten, die an dieser Krankheit leiden, zeigen ein deutlich geringeres Ansprechen auf Mitogene als die von gesunden Probanden (21, 24, 44, 80, 166). Daß eines dieser Mitogene, das Phytohämagglutinin, vorzugsweise T-Lymphozyten zur Proliferation anregt (74), bestätigt andere Untersuchungen, denen zufolge

beim M. Hodgkin eine Störung der T-Zellfunktion vorliegt (35, 44, 84, 120).

Bei zahlreichen Krankheiten mit autoaggressivem Charakter wie etwa dem Lupus erythematoses oder der chronisch aggressiven Hepatitis wurde in vitro eine verminderte Aktivität der Suppressorzellen festgestellt (20, 82). Diese Befunde bestätigen Fudenberg's Theorie, daß alle Autoaggressionskrankheiten auf einer genetisch determinierten Störung einer T-Zellsubpopulation, der Suppressorzellen, beruhen könnten (63).

1.4. Ziele der Untersuchung

Auch bei Patienten, die an dilatativer Kardiomyopathie (DCM) erkrankt waren, wurde eine erniedrigte Suppressorzellaktivität in vitro nachgewiesen (45, 46, 47, 60). Vorliegende Untersuchung beschäftigt sich mit der weiteren immunfunktionellen und immungenetischen Charakterisierung dieser prognostisch ungünstigen Erkrankung. Im einzelnen stellten wir uns folgende Fragen:

1. Weist die dilatative Kardiomyopathie typische bzw. veränderte immunfunktionelle Reaktionsmuster auf ?
2. Können solche Befunde Hinweise auf die nach wie vor ungeklärte Pathogenese der DCM geben ?
3. Gibt es in einem Kollektiv gesunder Probanden Personen mit ähnlichem immunfunktionellen Reaktionsmuster und tragen diese Personen möglicherweise ein erhöhtes Risiko der Erkrankung an DCM ?
4. Sind die von uns verwendeten Testsysteme geeignet, die Diagnostik der DCM zu ergänzen oder zu verbessern ?

5. Ergeben die Befunde dieser Untersuchung neue Aspekte für die Therapie der DCM ?

2. Material und Methoden

2.1. Probanden

2.1.1. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Ätiologie und Pathogenese der dilatativen Kardiomyopathie sind bis heute ungeklärt (100). Die differentialdiagnostische Abgrenzung gegen die Myokarditis, die immer wieder als Vor- oder Frühstadium der DCM angesehen wird, stellt nach wie vor ein Problem dar (108). Die DCM zeigt, wie die Myokarditis, mit Belastungsdyspnoe und Palpitationen klinische Zeichen der Herzinsuffizienz. Häufig findet man einen dritten Herzton sowie ein holosystolisches Gräusch über dem Mitralareal. Im Elektrokardiogramm können Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsstörungen vielfältiger Art nachweisbar sein. Röntgenologisch sieht man bei einem Großteil der Patienten einen vergrößerten Herzschatten und Zeichen der Lungenstauung. Sowohl echokardiographisch wie auch in der Herzkatheteruntersuchung sind eine Zunahme des linksventrikulären Durchmessers und Störungen der linksventrikulären Funktion erkennbar (21).

Die häufigsten Ursachen für eine Stauungsherzinsuffizienz sind in Europa und Nordamerika die koronare Herzkrankheit mit infarktbedingter Narbenbildung im Myokard und nachfolgender ischämischer Kardiomyopathie sowie die arterielle Hypertonie, welche unbehandelt nach längerem Verlauf zur hypertensiven Herzerkrankung mit linksventrikulärer Dilatation führt. Jede andere unbehandelte Herzerkrankung, dazu zählen auch angeborene oder erworbene Vitien, kann jedoch im Endstadium ebenfalls in die Stauungsherzinsuffizienz übergehen (37, 65, 91).

Gegenstand unserer Untersuchung waren ausschließlich die Stauungsherzinsuffizienzen unklarer Genese, die heute allgemein als dilatative Kardiomyopathien bezeichnet werden (91).

Patienten mit Stauungsherzinsuffizienzen anderer Ursachen wurden nicht in die Studie aufgenommen. Ausschlusskriterien waren das Vorliegen einer arteriellen Hypertonie, von Lungenerkrankungen, Herzklappenfehlern, angeborenen Vitien und der koronaren Herzkrankheit einschließlich "small vessel disease".

Weiter abgegrenzt wurde das Bild der dilatativen Kardiomyopathie durch invasive kardiologische Diagnostik der hämodynamischen Parameter (Tabelle 1) und durch histopathologische Beurteilung der gleichzeitig gewonnenen Myokardbiopsie. Die Myokardbiopsien wurden aus den septalen Anteilen des rechten Ventrikels entnommen (162). Die Proben wurden im Pathologischen Institut der Universität München von Professor Dr. Hübner und im National Heart and Chest Hospital, London, von Dr. Olsen befundet.

Histologisch findet man bei der dilatativen Kardiomyopathie eine Hypertrophie der Herzmuskelzellen sowie Narbenbildungen im Myokard mit Verdrängung des Herzmuskelgewebes durch Bindegewebe. Elektronenmikroskopisch sind Abnormitäten von Zellorganellen, insbesondere der Mitochondrien nachweisbar. Dagegen fehlen Zeichen der koronaren Herzkrankheit und der "small vessel disease" (5, 6, 139, 214).

Wir untersuchten in Zusammenarbeit mit Professor Bolte, Medizinische Klinik I, Klinikum Großhadern der Universität München, 46 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie, 37 Männer und 9 Frauen im Alter von 19 bis 67 Jahren ($\bar{x}$ = 46 Jahre, SD = 12 Jahre). Alle Patienten wurden wie beschrieben untersucht und hatten eine sowohl von Professor Hübner in München als auch von Dr. Olsen in London mit dilatativer Kardiomyopathie unklarer Genese vereinbar befundene Myokardbiopsie.

Tabelle 1: Hämodynamische Parameter im linken Ventrikel bei dilatativer Kardiomyopathie

	AF (%)	EDV (ml)	EDVI (ml/m ²)	LVEDP (mm Hg)	HI (l/min/m ²)
$\bar{x}$	0.34	223	111	24	2.3
SD	0.12	59	51	9	0.7

Diese hämodynamischen Parameter sind Ausdruck einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion bei der dilatativen Kardiomyopathie.

Abkürzungen: $\bar{x}$ = Mittelwert; SD = Standardabweichung; AF = Auswurf fraktion; EDV = enddiastolisches Volumen; EDVI = enddiastolischer Volumenindex; LVEDP = enddiastolischer Druck im linken Ventrikel; HI = Herzindex.

2.1.2. Kontrollen

Die Kontrollgruppe bestand aus 88 zum Zeitpunkt der Untersuchung gesunden Probanden, 32 Männern und 56 Frauen im Alter zwischen 17 und 57 Jahren ($\bar{x}$ = 31 Jahre; SD = 9 Jahre).

2.2. Untersuchungen

Aus frischem, heparinisiertem Vollblut der Probanden wurden durch Dichtegradientenzentrifugation mit Ficoll-Isopaque ($d = 1.077$, Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden) mononukleäre Zellen gewonnen, in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (pH 7.2.) gewaschen und in RPMI 1640-Kulturmedium mit

Hepespuffer, dem 1 % Penicillin-Streptomycin, 1 % L-Glutamin (Gibco Europe, Glasgow, Schottland) und 20 % humanes AB-Serum (BSD/BRK, München) zugesetzt war, aufgeschwemmt. Bei allen Probanden lag das Zahlenverhältnis von Lymphozyten zu Monozyten in der Zellsuspension bei 4 : 1. Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen zur Mitogen- und Antigenstimulation wurden in einem Mikrotiterplattenassay durchgeführt (47,49).

2.2.1. Mitogen- und Antigenstimulation

2.2.1.1. Mitogene

Als Mitogene werden Substanzen meist pflanzlicher Herkunft bezeichnet, die Lymphozyten zur Transformation anregen können (25). Durch Mitogene werden mehr oder weniger spezifische immunologische Reaktionen in vitro ausgelöst. Die so gewonnenen Erkenntnisse sind sicher nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse im Organismus übertragbar, doch dürften solche Versuche als Modell für die Reaktivität des Immunsystems in vivo durchaus brauchbar sein (22).

Hungerford und Nowell beschrieben 1959 erstmals die mitogene Eigenschaft des Phytohämagglutinins (PHA), eines Mukoproteins aus der roten Nierenbohne (*Phaseolus vulgaris*) (88). PHA stimuliert die DNS-Synthese und die mitotische Aktivität menschlicher T-Lymphozyten, nicht jedoch die von B-Zellen, obwohl diese ebenfalls PHA an ihrer Oberfläche binden können (44, 67, 75, 137, 201, 205).

Dagegen stimuliert Pokeweed Mitogen (PWM), ein Extrakt aus der Kermesbeere, vorzugsweise B-Lymphozyten und regt sie zur Synthese von Immunglobulinen an. Auch T-Zellen werden durch PWM angeregt. Von ihnen freigesetzte Lymphokine fördern wiederum die Proliferation von B-Lymphozyten (67, 75, 153, 201).

Concanavalin A (Con A), ein kohlenhydratfreies Lectin der Schwertbohne (*Canavalia ensiformis*) stimuliert in löslicher Form nur menschliche T-Lymphozyten. Von diesen angeregten Zellen freigesetzte Mediatorsubstanzen können zur Mitreaktionen von B-Lymphozyten führen (3, 43, 149, 201, 205). Außerdem wurde die Induktion von Suppressorzellen *in vitro* durch Con A beobachtet (130, 146, 160, 161, 179).

Die Zellwand der meisten Stämme von *Staphylococcus aureus* enthält ein Protein, das in Agargel mit menschlichen Gammaglobulinen präzipitiert (58, 90). Dieses sogenannte Staphylokokkenprotein A (SpA) ist ein potentes B-Zellmitogen (59, 131, 132).

Von jedem Probanden wurden je 10^5 Lymphozyten in Mikrotiterplatten (Greiner, Nürtingen) in 200 μ l Medium gegen folgende Mengen der obengenannten Mitogene exponiert: 12.5 μ g Protein A (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden), 12.5 μ g und 25 μ g Concanavalin A (Sigma Chemie, München), 2.5 μ g Poke-weed Mitogen und 1 μ g Phytohämagglutinin (Gibco Europe, Glasgow, Schottland). Die Mitogenkulturen wurden drei Tage bei 37° Celsius im Brutschrank in einer feuchten Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Alle Ansätze wurden sechsfach durchgeführt. Der Einbau von H³-Thymidin (Amersham International, Amersham, England) in die Lymphoblasten-DNS wurde mittels Flüssigszintillation unter Verwendung einer 6 g PPO und 10 mg POPOP auf 1 Liter Toluol enthaltene Szintillationsflüssigkeit (Carl Roth, Karlsruhe) gemessen (52).

2.2.1.2. Antigene

Analoge Stimulationsversuche führten wir mit einer Reihe bakterieller und viraler Antigene durch.

Varidase ist ein Gemisch aus den extrazellulären Streptokokkenproteinen Streptokinase und Streptodornase, wobei das

eigentliche lymphozytenstimulierende Antigen vermutlich ein Betaglobulin mit einem Molekulargewicht von etwa 21500 Dalton ist. Varidase ist ein guter Lymphozytenstimulator in vitro. Die Stärke der lymphozytären Reaktion ist möglicherweise HLA-assoziiert und zeigt eine gute Korrelation zur Stärke der Hautreaktion vom verzögerten Typ auf das gleiche Antigen. Es gibt offenbar unter gesunden Probanden Gruppen mit unterschiedlicher Reaktivität auf Varidase (77, 147, 194).

Tetanustoxoid, das im Tetanusadsorbatimpfstoff Tetanol^R (Behring, Marburg) als an Aluminiumhydroxid adsorbiertes, gereinigtes Tetanusformoltoxoid vorliegt, ist ein entgiftetes Ektotoxin von *Clostridium tetani*. Es stimuliert T-Lymphozyten immunisierter Individuen in Gegenwart von Makrophagen, wobei die Reaktion HLA-abhängig zu sein scheint und sich in vitro unter Gesunden zwei Gruppen mit differenter Reaktivität unterscheiden lassen, eine kleine Hochreagentengruppe und eine große Gruppe von Niedrigreagenten (23, 170).

Diphtherietoxoid, das entgiftete Ektotoxin von *Corynebacterium diphtheriae*, ein komplexes Protein, das in handelsüblicher Form als Aluminumformoltoxoid vorliegt, stimuliert T-Lymphozyten vorimmunisierter und nicht immunisierter Probanden gleichermaßen. Im immunisierten Kollektiv können wiederum Hoch- und Niedrigreagenten unterschieden werden (122).

Das Protein Tuberkulin, das durch fraktionierte Fällung aus Kulturfiltraten von *Mycobacterium tuberculosis* (typus humanus) gewonnen wird, bringt in vitro T-Lymphozyten zur Proliferation, wobei Probanden mit positivem Hauttest stärker reagieren als tuberkulinnegative Personen. Menschliche B-Lymphozyten werden durch Tuberkulin nicht stimuliert (54). Die T-Zellproliferation scheint von der

Antigenpräsentation durch Makrophagen abhängig zu sein und einer HLA-Restriktion zu unterliegen (14, 195).

Vacciniaantigen, das Antigen des im Pockenimpfstoff enthaltenen, abgeschwächten Kuhpockenvirus, das hinsichtlich seiner antigenen Eigenschaften weitgehend mit dem Pockenvirus identisch ist, stimuliert in vitro ebenfalls Lymphozyten, vor allem T-Killerzellen. Auch in diesem Fall scheint die Stärke der Reaktion HLA-assoziiert zu sein (19, 36, 79, 106, 138).

Masernantigen, das aus Masernvirus gewonnen wird und Komplement binden kann, stimuliert in vitro konzentrationsabhängig T-Lymphozyten, wie überhaupt die Immunreaktion gegen das Masernvirus T-lymphozytenabhängig ist. Die meisten T-Lymphozyten besitzen Oberflächenrezeptoren für dieses Virus (72, 167, 197, 215).

Vom komplementbindendem Rötelnantigen werden ebenfalls hauptsächlich T-Zellen zur Proliferation gebracht. Unmittelbar nach einer Impfung mit Rötelnimpfstoff lassen sich unter den Probanden Hoch- und Niedrigreagenten unterscheiden, wobei die Stärke der Reaktion proportional zum Antikörpertiter im Serum ist (93, 182).

Der Antigencocktail der Behringwerke setzt sich zusammen aus Streptolysin O, Tuberkulin GT, Tetanustoxoid, Mumpsantigen und Vacciniaantigen. Er stimuliert sowohl T- als auch B-Lymphozyten, wobei der H^3 -Thymidineinbau in die Lymphoblasten DNS in der Regel höher ist als in den übrigen Antigenssystemen.

Die Antigenstimulationsversuche wurden, mit Ausnahme der Inkubationszeit von 6 Tagen gegenüber 3 Tagen bei der Mitogenstimulation, in gleicher Weise wie dort beschrieben mit folgenden Endverdünnungen der Antigenstammlösungen durchge-

führt:

2 μ l Varidase (Lederle, Wolfratshausen), 2.5 μ l Tetanustoxoid, 2.5 μ l Diphtherietoxoid, 1 μ l Tuberkulin GT 1, 0.5 μ l Tuberkulin GT 10, 0.5 μ l Masernantigen, 0.5 μ l Vacciniaantigen, 16 μ l Rötelnantigen und 2.75 μ l Antigencocktail (Op 13) (Behring, Hamburg).

Antigenstimulation von Lymphozyten in vitro dürfte ein mindestens ebenso gutes Modell immunologischer Reaktionen in vivo sein wie die Mitogenkultur, da Antigene zu einer spezifischeren Stimulation von Lymphozyten führen als Mitogene. Es finden sich auch immer wieder Beziehungen zwischen Lymphozytenreaktivität in vitro und Antikörpertitern sowie Hautreaktionen bei untersuchten Probanden, was als Hinweis auf die biologische Relevanz dieser Testsysteme gewertet werden darf.

2.2.2. Suppressorzellassay

Zur Induktion von Suppressorzellaktivität wurde zu Lymphozytensuspensionen 10×10^6 Zellen in 2.5 ml Kulturmedium Concanavalin A (Sigma Chemie, München) bis zu einer Endkonzentration von 60 μ g/ml gegeben und anschließend diese Zellsuspension für 48 Stunden bei 37°C Celsius in einer feuchten CO₂-Atmosphäre inkubiert (60, 179). Bystanderzellen wurden, abgesehen von der Con A-Zugabe, analog behandelt. Die Responderzellen lagerten für diese 48 Stunden in flüssigem Stickstoff.

Zur Stimulation der Responderzellen diente in der gemischten Lymphozytenkultur ein Stimulatorzellpool, der Lymphozyten von fünf nicht verwandten, HLA-D-differenten Blutspendern enthielt. In den Mitogenkulturen wurden die Mitogene Protein A, Pokeweed Mitogen und Phytohämagglutinin in den bei der Besprechung der Mitogene angegebenen Endkonzentrationen verwendet. Um die Proliferationsaktivität der Bystander-,

Stimulator- und Suppressorzellen zu hemmen, wurden sie mit einer Cs^{137} -Quelle (Wälischmiller, Markdorf/Bodensee) mit 40 Gy bestrahlt.

Zur Untersuchung der Concanavalin A-induzierten Suppressorzellaktivität stimulierten wir 5×10^4 Responderzellen in Gegenwart von 5×10^4 Suppressorzellen des selben Probanden durch 5×10^4 Stimulatorzellen in der gemischten Lymphozytenkultur bzw. durch die genannten Mitogene in den Mitogenkulturen (b_1).

Als Kontrollen wurden analoge Stimulationen von Responderzellen durch Stimulatorzellen bzw. Mitogene in Gegenwart von Bystanderzellen durchgeführt (a_1).

Simultan wurden Mediumkontrollen (Responder- und Bystanderzellen gegen Medium: a_2 ; Responder- und Suppressorzellen gegen Medium: b_2) mitgeführt (47).

Alle Ansätze wurden wieder sechsfach durchgeführt und der H^3 -Thymidineinbau in die Responderblasten-DNS mittels Flüssigkeitsszintillation in einem Packard TRI-CARB 460 C Automatic Liquid Scintillation System-Counter (Packard Instrument Company Inc., Warrenville, USA) gemessen. Aus den so ermittelten Counts pro Minute errechneten wir den Hemmungsindex für die prozentuale Suppression der Responderzellblastopoesis durch Concanavalin A-aktivierte Lymphozyten nach der Formel:

$$\text{Suppression (\%)} = \left[1 - (b_1 - b_2)/(a_1 - a_2) \right] \times 100$$

Arithmetisch negative Suppressionswerte wurden gleich 0 % gesetzt (47).

Die Abbildung 1, S.23 gibt einen schematischen Überblick über den von uns durchgeführten Suppressorzellassay.

2.2.3. Bestimmung der T-Zellsubfraktionen

Unter Verwendung monoklonaler Antikörper wurden im Immunfluoreszenzassay folgende T-Zellsubfraktionen bestimmt:

OKT 3 = alle T-Zellen, OKT 4 = T-Helferzellen, OKT 8 = T-Suppressorzellen und zytotoxische T-Zellen (Ortho Diagnostic Systems, Raritan, New Jersey, USA). Das Verhältnis OKT4/OKT8 (Helfer-/Suppressorzellverhältnis) wurde aus den sich ergebenden Einzelwerten errechnet. Die Auswertung der Präparate erfolgte am Immunfluoreszenzmikroskop (Othoplan, Leitz, Wetzlar) (8, 109, 157, 158).

Das Grundprinzip des Assays ist in Abbildung 2 dargestellt.

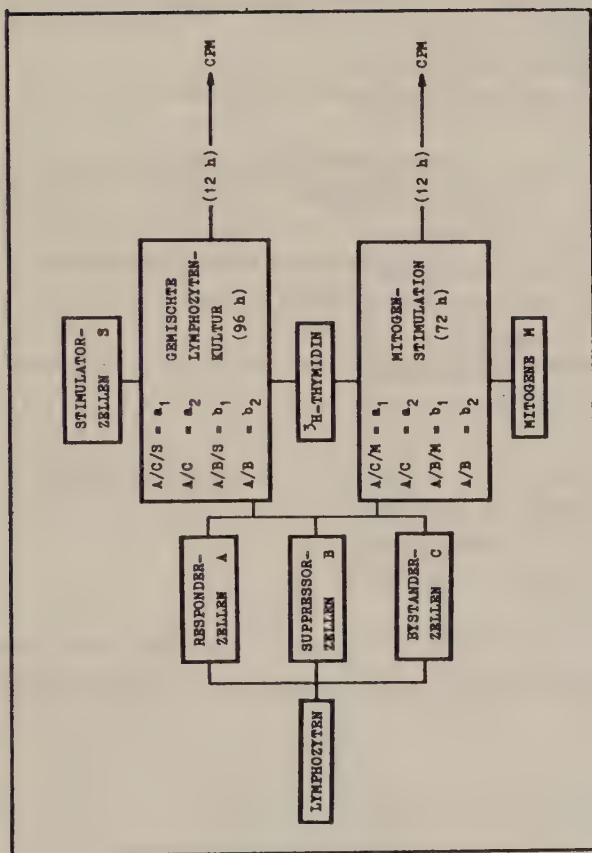
Eine Übersicht über alle durchgeführten Untersuchungen gibt die Tabelle 2 wieder.

2.3. Statistische Analysen

Zum Vergleich der Werte von Patientenkollektiv und Kontrollgruppe verwendeten wir zunächst den t-Test für unverbundene Stichproben ungleicher Varianz.

Als Ergebnis des Tests erhält man einen Wert p , der ein Maß für die Gleichheit oder Ungleichheit der beiden gegeneinander getesteten Gruppen ist. Je kleiner der Wert ist, umso mehr unterscheiden sich die Gruppen voneinander. In biologischen Systemen spricht man von einem signifikanten Unterschied ab einem p -Wert $< 0,05$.

Abbildung 1: Suppressorzellassay



Abkürzungen: a₁ = Responderzellen in Gegenwart allogener Stimulatorzellen oder Mitogene und autologer Bystanderzellen; a₂ = Responderzellen und autologe Bystanderzellen allein; b₁ = Responderzellen in Gegenwart autologer Con A-behandelter Lymphozyten und allogener Stimulatorzellen oder Mitogene; b₂ = Responderzellen und autologe Con A-behandelte Lymphozyten (Suppressorzellen) allein; CPM = counts pro Minute; A = Responderzellen; C = Bystanderzellen; B = Suppressorzellen; M = Mitogene; S = Stimulatorzellen; h = Stunden

Abbildung 2: Grundprinzip der T-Zellsubpopulationsbestimmung mit monoklonalen Antikörpern.

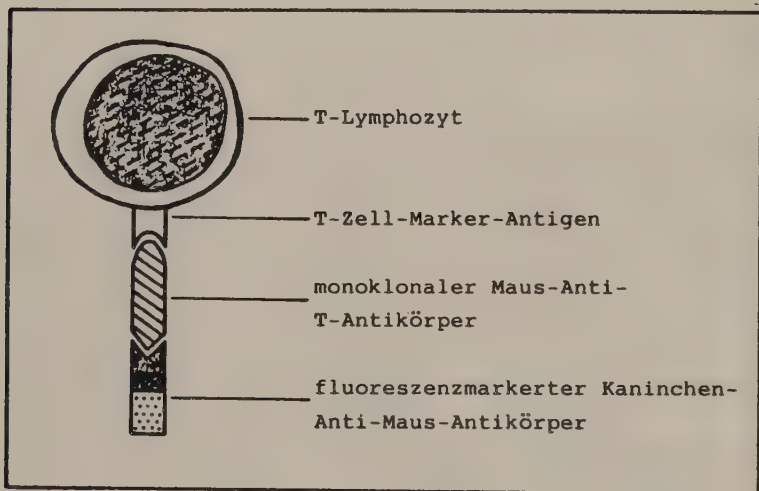


Tabelle 2: Übersicht über die durchgeführten Untersuchungen

Immunfunktionelle Untersuchungen:

1. Mitogenstimulationen: Protein A (SpA)
Concanavalin A (Con A)
Pokeweed Mitogen (PWM)
Phytohämagglutinin (PHA)
2. Antigenstimulationen: Varidase
Tetanustoxoid
Diphtherietoxoid
Tuberkulin
Vacciniaantigen
Masernantigen
Rötelnantigen
Antigencocktail
3. Suppressorzellen: Protein A (SpA)
Pokeweed Mitogen (PWM)
Phytohämagglutinin (PHA)
gemischte Lymphozytenkultur
(MLC)

Bestimmung von T-Lymphozyten und T-Zellsubpopulationen:

1. OKT 3: alle T-Zellen
2. OKT 4: T-Helferzellen
3. OKT 8: T-Suppressorzellen und zytotoxische
T-Effektorzellen
4. OKT 4/8: Helfer-Suppressorzellverhältnis

3. Ergebnisteil 1

3.1. Mitogen- und Antigenstimulation

3.1.1. Mitogene

Es bestehen hoch signifikante Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe bei der Lymphozytenreaktivität gegen Concanavalin A (25 μ g) und gegen Phytohämagglutinin ($p < 0.01$) (Tabelle 3, Abbildungen 3 und 4). Bei den Reaktionen gegen Protein A, Concanavalin A (12,5 μ g) und Pokeweed Mitogen liegen zwar durchwegs die Mittelwerte des Patientenkollektivs höher als die der Kontrollgruppe, die Differenzen sind jedoch nicht statistisch signifikant.

3.1.2. Antigene

Gegen Masernantigen reagieren die Lymphozyten der Patientengruppe signifikant höher als die der Kontrollgruppe ($p < 0.05$) (Abb. 5).

In den Reaktionen gegen Tetanustoxoid, Diphtherietoxoid, Tuberkulin GT 1 und GT 10, Vacciniaantigen sowie Rötelnantigen zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Tab. 4).

3.2. Suppressorzellaktivität

Außer im Phytohämagglutininsystem ist die Suppressorzellaktivität der Patientengruppe in allen getesteten Systemen gegenüber den Kontrollen erniedrigt. Die Unterschiede sind statistisch hoch signifikant im Protein-A- und im Pokeweed-Mitogen-System ($p < 0.001$ bzw. $p < 0.01$) und höchst signifikant in der gemischten Lymphozytenkultur ($p < 0.00005$) (Tab. 5, Abb. 6, 7 und 9).

Bemerkenswert erscheint die große Streubreite der Kontrollgruppe, so daß auch gesunde Probanden ebenso

niedrige Suppressorzellaktivität aufweisen wie Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (Abb. 6, 7 und 8).

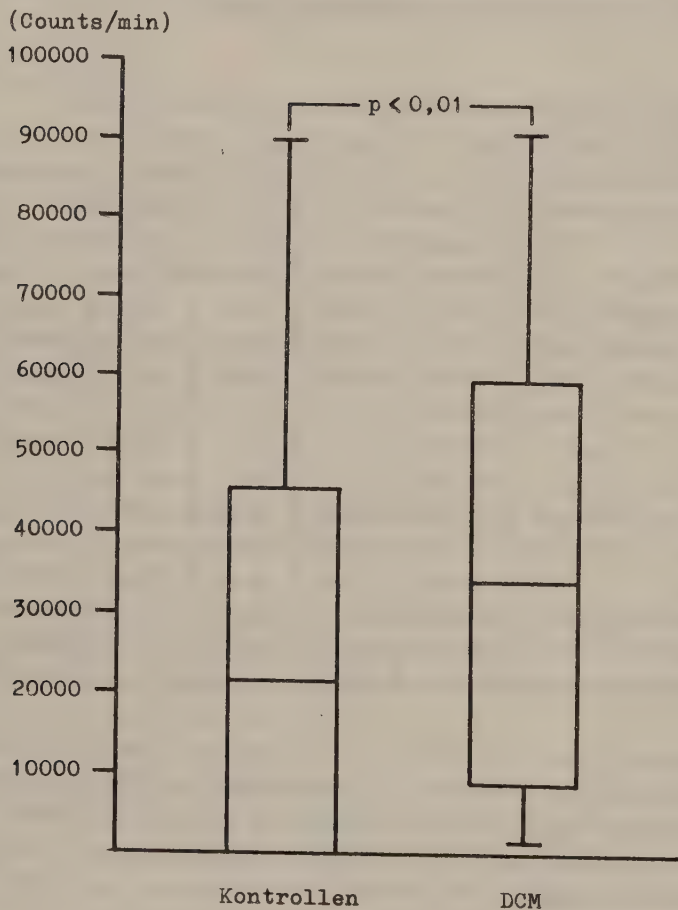
Tabelle 3: Lymphozytenreaktivität auf Mitogene (cpm)

Mitogene	DCM (n = 46)		p	Kontrollen (n = 88)	
	$\bar{x}$	SD		$\bar{x}$	SD
SpA	3483	5681	n.s.	2155	2382
Con A (25 μ g)	33543	25262	0.01	21104	23100
Con A (12,5 μ g)	16563	12586	n.s.	11815	12057
PWM	28858	23700	n.s.	20440	21426
PHA	162421	88479	0.01	119266	82810

Lymphozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie reagieren auf Concanavalin A (25 μ g) und Phytohämagglutinin signifikant höher als die von gesunden Kontrollprobanden. Die Mittelwerte der Lymphozytenreaktivität liegen im allgemeinen höher als bei den Kontrollen.

Abkürzungen: DCM = dilatative Kardiomyopathie; cpm = counts per minute; $\bar{x}$ = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant; SpA = Protein A; Con A = Concanavalin A; PWM = Pokeweed Mitogen; PHA = Phytohämagglutinin.

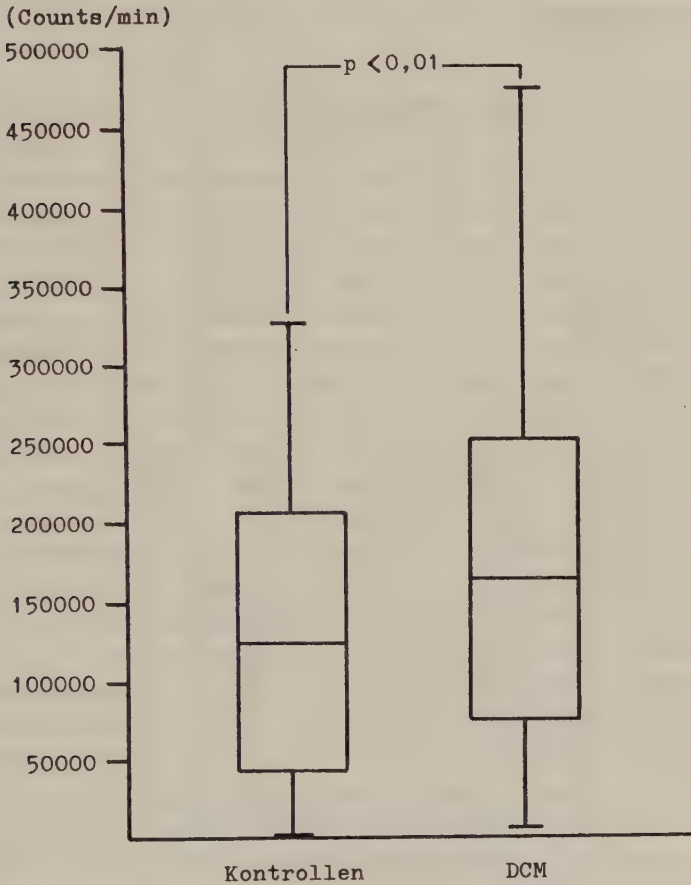
Abbildung 3: Lymphozytenreaktivität auf Concanavalin A
(25 μ g)



Lymphozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie reagieren statistisch signifikant stärker als die der Kontrollprobanden.

Abkürzungen: DCM = dilatative Kardiomyopathie

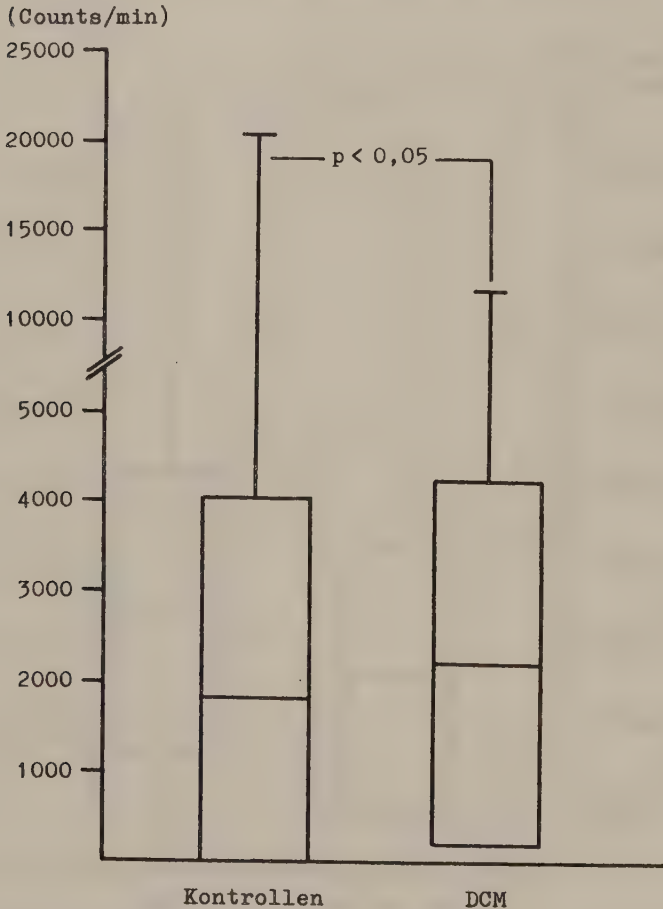
Abbildung 4: Lymphozytenreaktivität auf Phytohämagglutinin:
DCM gegen Kontrollgruppe



Lymphozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie reagieren statistisch signifikant stärker als die der Kontrollprobanden.

Abkürzung: DCM = dilatative Kardiomyopathie

Abbildung 5: Lymphozytenreaktivität auf Masernantigen, DCM gegen Kontrollgruppe



Lymphozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) reagieren statistisch signifikant stärker als die der Kontrollen.

Abkürzungen: DCM = dilatative Kardiomyopathie

Tabelle 4: Lymphozytenreaktivität auf Antigene (cpm)
dilatative Kardiomyopathie gegen Kontrollgruppe

Antigene	DCM (n = 44)		p	Kontrollen (n = 88)	
	$\bar{x}$	SD		$\bar{x}$	SD
Varidase	4556	6198	n.s.	3807	6734
Tetanustoxoid	9038	14261	n.s.	10439	19065
Diphtherietoxoid	11494	18951	n.s.	10397	34691
Tuberkulin GT 1	2175	1620	n.s.	2485	3453
Tuberkulin GT 10	2997	4219	n.s.	2584	3828
Masernantigen	2259	2067	0.05	1684	2301
Vacciniaantigen	3030	3227	n.s.	4220	8777
Rötelnantigen	1727	1581	n.s.	2053	3307
Antigencocktail	20327	23116	n.s.	13966	21165

Lymphozyten von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie reagieren auf Masernantigen signifikant höher als die von gesunden Kontrollprobanden. In den übrigen Antigensystemen verhalten sie sich analog zur Kontrollgruppe.

Abkürzungen: DCM = dilatative Kardiomyopathie; $\bar{x}$ = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n.s. = nicht signifikant

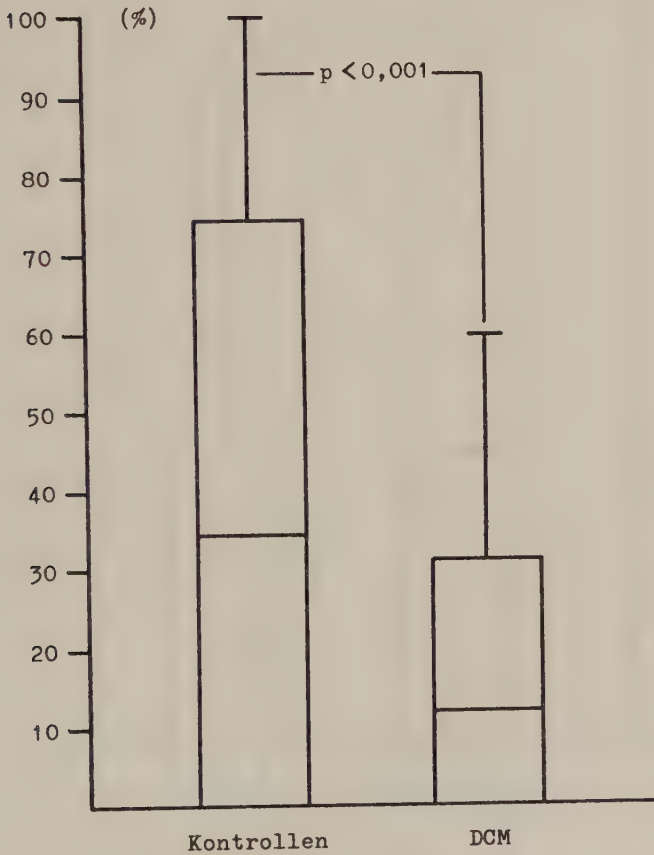
Tabelle 5: Suppressorzellaktivität (%) - DCM

	DCM			Kontrollen	
Testsystem	$\bar{x}$	SD	p	$\bar{x}$	SD
SpA	12 %	19 %	0.001	33 %	40 %
PWM	15 %	21 %	0.01	36 %	38 %
PHA	33 %	25 %	n.s.	32 %	35 %
MLC	14 %	29 %	0.00005	56 %	35 %

Die Suppressorzellaktivität von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie ist im Protein-A- und im PWM-System gegenüber der von gesunden Kontrollprobanden signifikant erniedrigt.

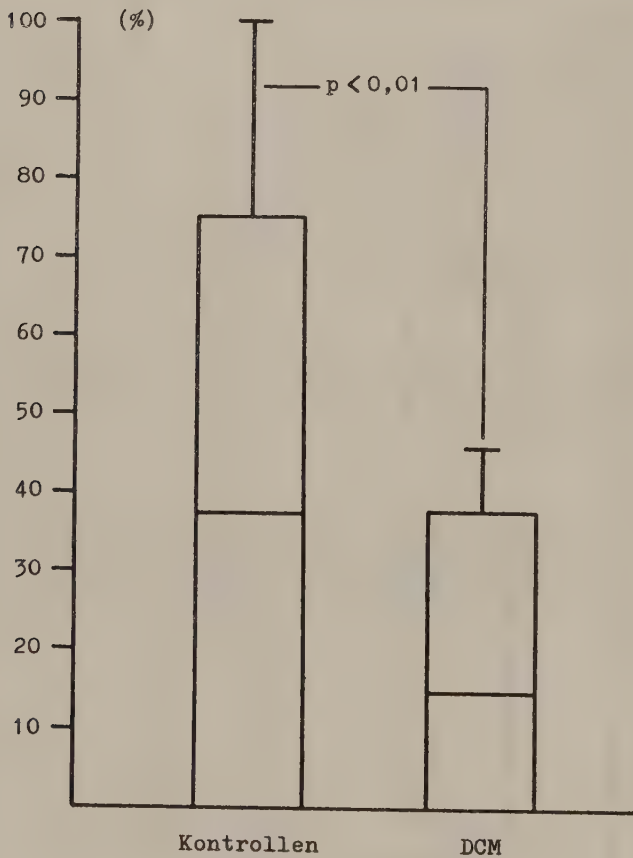
Abkürzungen: $\bar{x}$ = Mittelwert; SD = Standardabweichung; p = p-Wert; SpA = Protein A; PWM = Pokeweed Mitogen; PHA = Phytohämagglutinin; MLC = gemischte Lymphozytenkultur.

Abbildung 6: Suppressorzellaktivität (%) - Protein A:



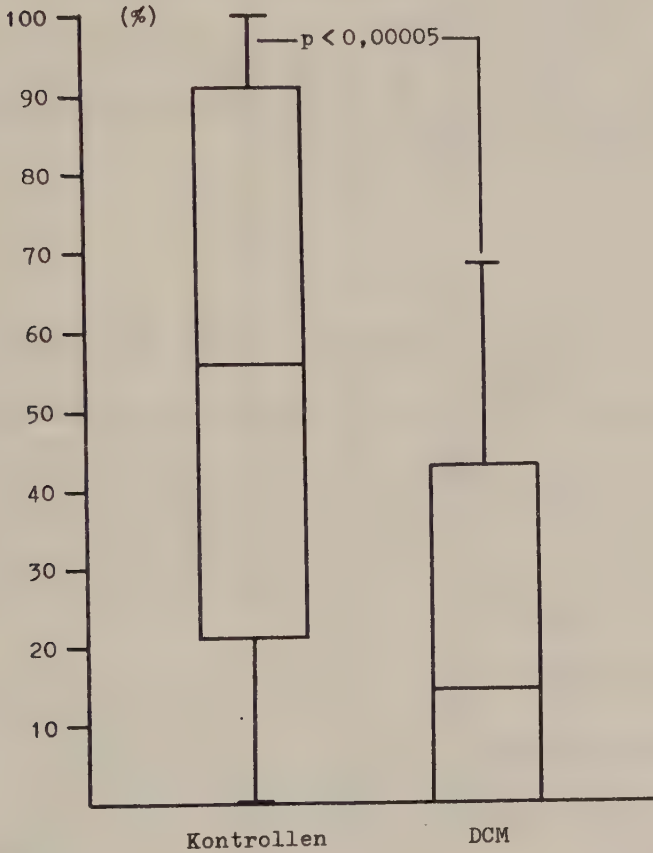
Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) zeigen im Protein-A-System eine gegenüber den Kontrollprobanden statistisch signifikant erniedrigte Suppressorzellaktivität.

Abbildung 7: Suppressorzellaktivität (%) - Pokeweed Mitogen



Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) zeigen im Pokeweed-Mitogen-System eine gegenüber den Kontrollprobanden signifikant erniedrigte Suppressorzellaktivität.

Abbildung 8: Suppressorzellaktivität (%) - gemischte
Lymphozytenkultur



Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) zeigen in der gemischten Lymphozytenkultur eine gegenüber den Kontrollprobanden signifikant erniedrigte Suppressorzellaktivität.

3.3. T-Zellsubpopulationen:

Zwischen Patienten- und Kontrollgruppe finden sich keine wesentlichen Unterschiede bei den Lymphozytenzahlen im peripheren Blut sowie bei den absoluten Zahlen der T-Zellen und ihrer Subpopulationen.

Da die T-Zellsubpopulationen auch jeweils gleich hohe prozentuale Anteile an der Gesamtmenge der T-Zellen in beiden Gruppen haben, zeigt auch das T 4/8-Verhältnis keinen signifikanten Unterschied. (Tabelle 6)

Tabelle 6: T-Zellsubfraktionen - DCM und Kontrollgruppe

	DCM (n = 46)		p	Kontrollen (n = 88)	
	$\bar{x}$	SD		$\bar{x}$	SD
T-Zellen, gesamt OKT 3	41 %	10 %	n.s.	42 %	13 %
T-Helferzellen OKT 4	26 %	11 %	n.s.	25 %	10 %
T-Suppressorzellen OKT8	19 %	8 %	n.s.	19 %	7 %
OKT 4/OKT 8	1.6	1.0	n.s.	1.5	0.9

Die prozentualen Anteile der T-Zellen und der T-Zellsubfraktionen sowie das OKT 4/8-Verhältnis zeigen keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe.

Tabelle 7: T-Zellsubfraktionen (absolute Zahl/ μ l)

	DCM (n = 46)		p <	Kontrollen (n = 88)	
	$\bar{x}$	SD		$\bar{x}$	SD
Lymphozyten	2099	584	n.s.	2067	612
T-Zellen	840	321	n.s.	1031	375
T-Helferzellen	504	224	n.s.	617	280
T-Suppressorzellen	427	247	n.s.	482	214

Zwischen DCM und Kontrollgruppe bestehen keine Unterschiede in Bezug auf Lymphozyten-, T-Zell-, T-Helferzell- und T-Suppressorzellzahlen. Alle liegen im peripheren Blut in normaler Anzahl vor.

3.4. Diskussion Ergebnisteil I

Bei kritischer Betrachtung unserer Methoden muß zunächst darauf hingewiesen werden, daß die Übertragung von in-vitro-Untersuchungen auf die Verhältnisse im lebenden menschlichen Organismus grundsätzlich problematisch und nur mit Vorbehalt möglich ist. Zudem wurden alle unsere Tests mit aus peripherem Blut gewonnenen Lymphozyten durchgeführt, einem relativ kleinem Kompartiment des lymphatischen Systems, das seinerseits wiederum nur einen, wenn auch sehr bedeutenden Teil des gesamten Immunsystems darstellt.

Für die Verwendung von Lymphozyten lassen sich dennoch

einige positive Aspekte anführen. Zum einen sind diese Versuche am Menschen nicht durchführbar. Das Tierexperiment als Modell für die Reaktion eines lebenden Organismus bringt mindestens ebenso viele Probleme bei der Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen mit sich wie die Untersuchung an menschlichen Lymphozyten in vitro. Da hierzu nur eine relativ geringe Menge an Material notwendig ist und die Lymphozyten ohne Schwierigkeiten aus dem Blut separiert werden können, erscheint die Lymphozytenkultur als durchaus brauchbares Modell des menschlichen Immunsystems (22, 115).

Unter Berücksichtigung dieser Einschränkungen ist es offenbar möglich, das Reaktionsmuster unseres Patientenkollektivs zu beschreiben und Abweichungen vom Verhalten der Kontrollgruppe zu erkennen.

Zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv war in den meisten getesteten Systemen kein wesentlicher Unterschied in der Reaktivität ihrer Lymphozyten gegen Mitogene und Antigene feststellbar. Lediglich in 3 von 14 Systemen (Con A 25 ug, PHA, Masernantigen) erwies sich die Reaktion der Patienten-Gruppe signifikant höher als die der Kontrollgruppe.

Die T-Zellsubfraktionen beider Gruppen verhielten sich analog. Sowohl die absoluten Zahlen pro Mikroliter Blut wie auch der prozentuale Anteil der T-Zellen (OKT 3), T-Helferzellen (OKT 4) und T-Suppressor- bzw. zytotoxischen T-Zellen (OKT 8) waren bei den Patienten und Kontrollprobanden gleich.

Ein signifikanter bzw. höchst signifikanter Unterschied zeigte sich im Suppressorzellassay. Im Protein-A- und im Pokeweed-Mitogen-System sowie in der gemischten Lymphozytenkultur war die Suppressorzellaktivität der Kardiomyopathiepazienten niedriger als die der gesunden Probanden.

Damit konnten wir in einem nach Eckstein modifizierten

Suppressorzellassay (45, 46, 47, 48, 49) frühere Ergebnisse von Fowles und Mitarbeitern bestätigen (60).

Als Ursache der erniedrigten Suppressorzellaktivität kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht. Es könnte eine quantitative Verminderung des Suppressorzellkompartiments vorliegen. Die Bestimmung der entsprechenden T-Zellsubpopulationen mit monoklonalen Antikörpern (OKT 8) ergab zwar keinen wesentlichen Unterschied zwischen Patienten und Normalprobanden, da jedoch im OKT-8-positiven Kompartiment sowohl Suppressorzellen wie auch zytotoxische T-Effektorzellen enthalten sind, kann eine zahlenmäßige Verminderung der Suppressorzellen zu Gunsten der zytotoxischen T-Zellen nicht ausgeschlossen werden. Des weiteren besteht die Möglichkeit eines funktionellen Defekts bei normaler Anzahl der Suppressorzellen. Außerdem könnte die verminderte Suppressorzellaktivität Ausdruck einer genetisch determinierten Variante des Immunsystems sein.

Fudenberg formulierte 1971 die Hypothese, daß alle Autoaggressionskrankheiten durch genetisch determinierte Defekte einer T-Zellsubpopulation charakterisiert sein könnten (63). Belegt wurde diese Hypothese unter anderem an Patienten mit Lupus erythematodes oder chronisch aggressiver Hepatitis, beides Autoaggressionskrankheiten, die eine erniedrigte Suppressorzellaktivität aufweisen (20, 82).

Niedrige Suppressorzellaktivität wie bei der dilatativen Kardiomyopathie wurde auch für die Myokarditis, die ja häufig als Vor- oder Frühstadium der Kardiomyopathie bezeichnet wird, beschrieben (45, 46, 47, 53, 118).

Hinweis auf den autoaggressiven Charakter beider Erkrankungen gibt auch der Nachweis an myokardiale Strukturen gebundener Antikörper (17, 18). Eine Beteiligung autoaggressiver Mechanismen bei der Myokarditis wurde bereits im Tier-

experiment bestätigt (86).

Die Myokarditis entwickelt sich im Verlauf einer Virusinfektion, wobei vor allem Coxsackie-B-Viren von Bedeutung zu sein scheinen (86, 210). Nicht selten geht die klinisch manifeste Erkrankung in eine chronische Form über, die nach längerem Verlauf nicht mehr von der dilatativen Kardiomyopathie zu unterscheiden ist (105, 209).

Eine inadäquate Immunreaktion gegen Coxsackieviren könnte auf einer genetisch bedingten Verminderung der Suppressorzellaktivität beruhen, was wiederum zur Autoaggression gegen Herzmuskelgewebe führen könnte. Die niedrige Suppressorzellaktivität wäre somit ein prädisponierender Faktor für den Übergang einer Myokarditis in die dilatative Kardiomyopathie (53).

Für eine autoaggressive Komponente bei einem Teil der Myokarditiden sprechen auch bisherige Erfahrungen mit immunsuppressiven Therapieversuchen. Ein Teil der Erkrankungen kam unter Therapie zur Ausheilung, bei einigen anderen Fällen wurde eine Verschlechterung des Krankheitsbildes beobachtet (98, 101, 163), was die Folge der Unterdrückung von Immunreaktionen während einer akuten Infektion gewesen sein dürfte.

Mit entscheidend für den Erfolg einer immunsuppressiven Therapie dürfte die richtige Auswahl der Patienten sein. Die Myokardbiopsie ist bislang die einzige Möglichkeit die Diagnose Myokarditis bzw. dilatative Kardiomyopathie zu sichern (140, 163). Daneben könnte der Nachweis einer verminderten Suppressorzellaktivität auf ein autoaggressives Geschehen hinweisen. In diesem Fall könnte der Versuch einer immunsuppressiven Therapie auch bei der dilatativen Kardiomyopathie in Erwägung gezogen werden.

Bei der Betrachtung unserer Ergebnisse fällt auf, daß eine Reihe von gesunden Probanden ähnlich niedrige

Suppressorzellaktivitäten aufwies wie die Patienten der DCM-Gruppe. Wir stellten uns die Frage, ob sich innerhalb des Kontrollkollektivs Gruppen von Normalprobanden mit unterschiedlicher Immunfunktion definieren lassen. Zur Klärung dieser Frage führten wir eine Multivarianzanalyse unserer Meßwerte durch, deren Resultate im Ergebnisteil II dargelegt sind.

TEIL II: CLUSTERANALYSE

4. Ergebnisteil II - Clusteranalyse

4.1. Statistische Methoden

Sämtliche von uns bestimmten immunologischen Parameter der Patienten und Kontrollprobanden wurden gleichwertig, also nicht nach hierarchischen Kriterien gewichtet, einer sogenannten Clusteranalyse unterzogen. Diese Multivarianzanalyse wurde an der University of California entwickelt und verbessert (BMDP2M - Cluster Analysis of Cases; BMDP Statistical Software Inc., 1964 Westwood Blvd Suite 202 (213) 4755700; Program revised April 1982 - Manual revised 1981; Copyright (c) 1982 Regents of University of California.)

Als Ähnlichkeits- oder Abstandsmaß wurde die mit der inversen Kovarianzmatrix gewichtete Summe der Differenzquadrate zwischen den einzelnen Parametern genommen, der sogenannte RAO-Abstand, der für jedes Probandenpaar berechnet wurde. In einem anschließenden Amalgamationsprozeß wurde zunächst das Probandenpaar mit dem geringsten RAO-Abstand zu einem Cluster zusammengefaßt, der durch die Mittelwerte seiner immunologischen Parameter gekennzeichnet war. Dann wurde erneut der Abstand jedes einzelnen Probanden zu diesem Cluster berechnet. Je nach Größe des Abstandes wurde der Proband dann dem Cluster zugeordnet oder mit dem Probanden, der den geringsten Abstand zu ihm hatte, zu einem neuen Cluster zusammengefaßt.

Um zu überprüfen, ob sich die auf diese Weise gefundenen Cluster statistisch signifikant voneinander unterscheiden, wurde als Diskriminanzanalyse der F-Test gerechnet, wobei eine Signifikanz bei F-Werten > 4 angenommen werden kann. Gleichzeitig wurden auch die Unterschiede in den Einzeltestsystemen mit dem auch in Teil I angewandten t-Test für unverbundene Stichproben ungleicher Varianz überprüft. Wie schon dort bemerkt, kann man in einem biologischen

Testsystem von einer statistischen Signifikanz bei p-Werten < 0.05 sprechen.

Diese Auswertungen wurden in der Hauptsache am Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover bei Professor Dr. B. Schneider durchgeführt, dem wir für seine hervorragende mathematische Beratung bei der Analyse der Ergebnisse zu großem Dank verpflichtet sind.

4.2. Kontrollen:

4.2.1. Ergebnisse:

In der Clusteranalyse zeigte sich, daß unser 88 Personen umfassendes Kontrollkollektiv aus drei immunfunktionell unterschiedlichen Gruppen besteht.

Die Gruppe 1 wird von 18 Probanden gebildet, deren Lymphozyten auf Stimulation durch Mitogene und Antigene mittelhoch reagieren. Die Gruppe 2 besteht aus 49 niedrig reagierenden Kontrollpersonen, während die 21 Probanden der Gruppe 3 eine hohe lymphozytäre Reaktion nach Stimulation durch Mitogene und Antigene zeigen (siehe Tab. 9 und Tab.10).

Die drei Gruppen sind hinsichtlich dieser Parameter in sich homogen, unterscheiden sich jedoch voneinander statistisch signifikant (Tabelle 11 und 12). Die Niedrigreagentengruppe 2 zeigt in zehn von vierzehn Testsystemen signifikant geringere cpm-Werte als die Gruppe 1. Noch deutlicher ist der Unterschied zur Gruppe 3. Hier sind die Meßwerte der Gruppe 2 in allen getesteten Mitogen- und Antigensystemen signifikant niedriger als die der Hochreagentengruppe 3 (p-Werte zwischen $p < 0.03$ und $p < 0.00005$). Die Lymphozyten der Probanden von Gruppe 1 und 3 reagieren in den drei Testsystemen Protein A, Concanavalin A (12.5 μ g) und Tetanus-

toxoid gleich hoch. Im Concanavalin A-System (25 µg) liegen die Meßwerte der Gruppe 1 höher ($p < 0.01$), während die Reaktion gegen alle anderen Mitogene und Antigene signifikant niedriger sind als die der Gruppe 3 (p -Werte zwischen $p < 0.05$ und $p < 0.0005$).

Die Abbildungen 9 bis 22 zeigen Mittelwerte, Standardabweichung sowie Minimal- und Maximalwerte der drei Gruppen in den einzelnen Mitogen- und Antigentestsystemen.

Suppressorzellaktivität (Tab. 13) wie auch absolute Zahlen und Kompartimentgrößen der T-Zellen (OKT 3, OKT 4, OKT 8) (Tab.14), sowie das Verhältnis OKT 4- zu OKT 8-positiver Zellen tragen interessanterweise wenig zur Diskriminierung der drei Gruppen bei. Für keinen dieser Parameter ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Clustern. Dies gilt auch für die Alters- und Geschlechtsverteilung der Probanden in den einzelnen Gruppen (siehe folgende Tabelle 8).

Tabelle 8: Alters- und Geschlechtsverteilung der Probanden in den einzelnen Clustern.

		Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Alter (a)	$\bar{x}$	30	30	31
	SD	9	9	8
Geschlecht	m	28 %	29 %	38 %
	w	72 %	71 %	62 %

Abkürzungen: a = Jahre; $\bar{x}$ = Mittelwert; SD = Standardabweichung; m = männlich; w = weiblich.

Tabelle 9: Kontrollcluster - Lymphozytenreaktivität auf Mitogene (counts/min).

CLUSTER	Gruppe 1 (n = 18)		Gruppe 2 (n = 49)		Gruppe 3 (n = 21)	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
SpA	3023	3030	1434	892	3478	3657
Con A (25 ug)	37705	25560	10985	11934	27822	30481
Con A (12.5 ug)	17206	11178	4905	4766	20336	14312
PWM	24507	18565	10451	11098	36215	22680
PHA	147362	75529	82103	70330	188656	79764

Die Lymphozyten von Probanden der Gruppe 1 reagieren mittel-hoch, die der Gruppe 2 niedrig und die der Gruppe 3 hoch auf Stimulation mit Mitogenen.

Abkürzungen: n = Fallzahl; $\bar{x}$ = Mittelwert; SD = Standardabweichung; SpA = Protein A; Con A = Concanavalin A; PWM = Pokeweed Mitogen; PHA = Phytohämagglutinin.

Tabelle 10: Kontrollcluster - Lymphozytenreaktivität auf Antigene (counts/min)

Antigene	Gruppe 1 (n = 18)		Gruppe 2 (n = 49)		Gruppe 3 (n = 21)	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Varidase	2377	1707	2167	2389	9429	12508
Tetanustoxoid	12102	13442	2597	3235	23287	27823
Diphtherietoxoid	5370	6902	1973	5215	36454	69109
Tuberkulin GT 1	1930	1445	1483	1265	5582	6185
Tuberkulin GT 10	2157	2007	1456	1255	5377	6626
Masernantigen	1512	969	1010	592	3527	437
Vacciniaantigen	2407	1376	1602	1101	12061	16606
Rötelnantigen	1481	1377	1281	1156	4541	6245
Antigencocktail	8548	10172	5834	7956	38063	31812

Die Lymphozyten von Probanden der Gruppe 1 reagieren mittel-hoch, die der Gruppe 2 niedrig und die der Gruppe 3 hoch auf Stimulation durch Antigene.

Abkürzungen: $\bar{x}$ = Mittelwert; SD = Standardabweichung; n = Fallzahl.

Tabelle 11: Statistische Signifikanzen der Unterschiede in der lymphozytären Reaktion auf Mitogene zwischen den Kontrollclustern.

		Gruppe 1/2	Gruppe 1/3	Gruppe 2/3
Mitogene	F	p <	p <	p <
SpA	6.9	0.003	n.s.	0.01
Con A (25 ug)	12.7	0.0005	0.005	0.01
Con A (12.5 ug)	25.2	0.0005	n.s.	0.00005
PWM	19.9	0.005	0.05	0.00005
PHA	16.8	0.00005	0.01	0.00005

Die drei Kontrollcluster unterscheiden sich in der lymphozytären Reaktion ihrer Probanden auf Stimulation durch Mitogene statistisch signifikant.

Abkürzungen: F = F-Wert; p = p-Wert; SpA = Protein A; Con A = Concanavalin A; PWM = Pokeweed Mitogen; PHA = Phytohämagglutinin

Tabelle 12: Statistische Signifikanzen der Unterschiede in der lymphozytären Reaktion auf Antigene zwischen den Kontrollclustern.

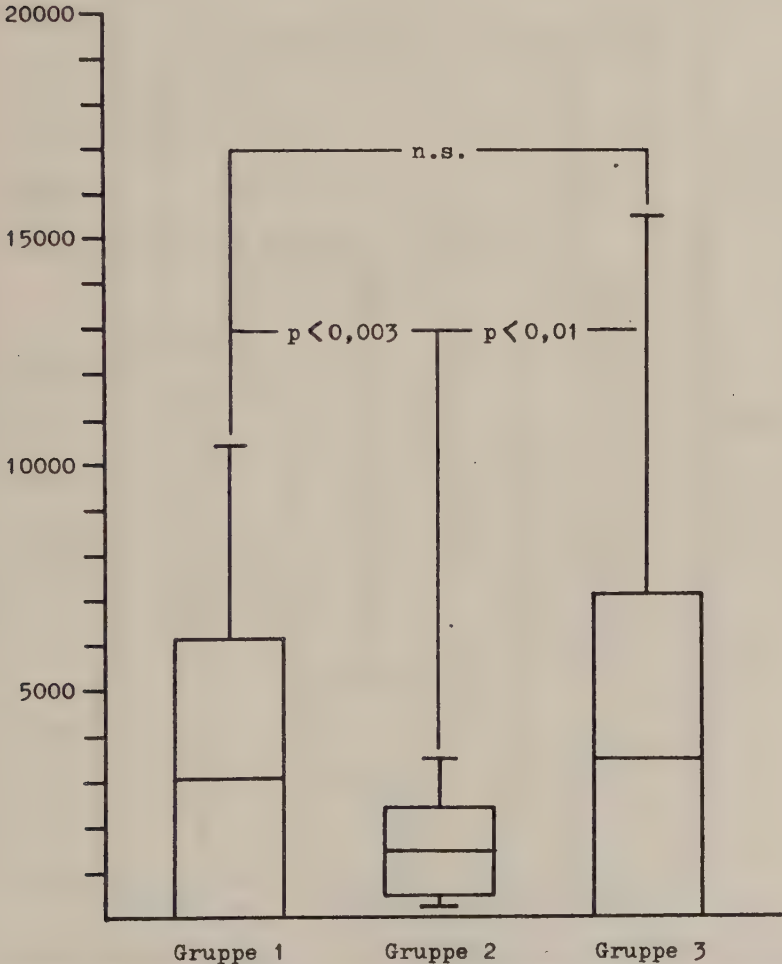
		Gruppe 1/2	Gruppe 1/3	Gruppe 2/3
Antigene	F	p <	p <	p <
Varidase	10.2	n.s	0.01	0.01
Tetanustoxoid	14.4	0.005	n.s.	0.003
Diphtherietoxoid	7.9	0.05	0.05	0.03
Tuberkulin GT 1	12.4	n.s.	0.003	0.005
Tuberkulin GT 10	9.5	n.s.	0.03	0.01
Masernantigen	9.6	0.05	0.05	0.01
Vacciniaantigen	12.8	0.03	0.01	0.005
Rötelnantigen	8.0	n.s.	0.03	0.03
Antigencocktail	27.1	0.02	0.0005	0.0005

Die lymphozytäre Reaktion der drei Kontrollcluster auf Stimulation durch Antigene unterscheidet sich statistisch signifikant, wobei sich die Gruppe 3 (Hochreagenten) stärker von den Gruppen 1 und 2 unterscheidet als diese beiden Gruppen sich von einander unterscheiden.

Abkürzungen: F = F-Wert; p = p-Wert; n.s. = nicht sig.

Abbildung 9: Kontrollcluster - Lymphozytenreaktivität auf Protein A (SpA)

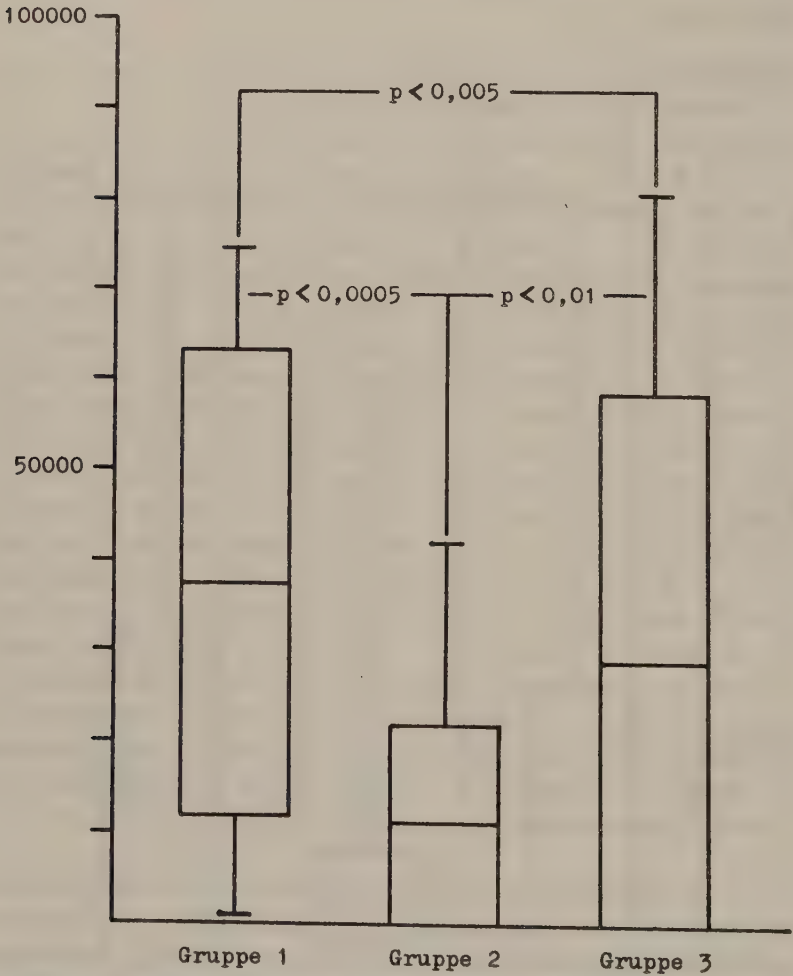
(Counts/min)



Lymphozyten von Probanden der Gruppe 2 reagieren signifikant niedriger als die der beiden anderen Gruppen, die sich ihrerseits hinsichtlich ihrer Lymphozytenreaktivität auf Protein A nicht signifikant unterscheiden.

Abbildung 10: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf Concanavalin A (25 μ g)

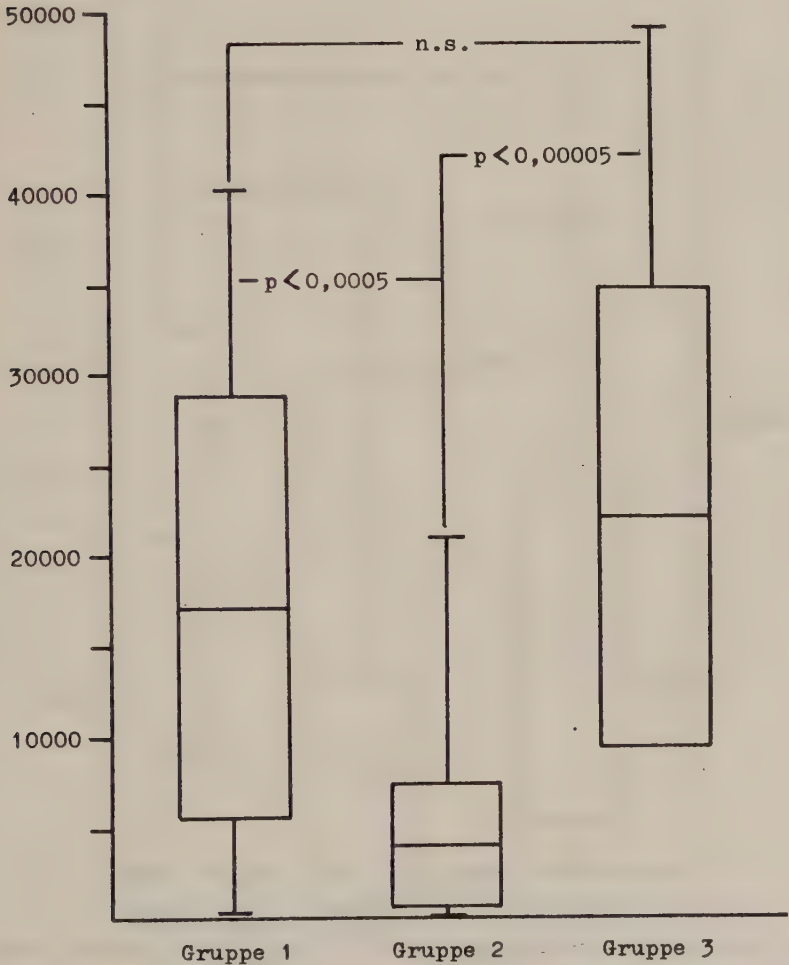
(Counts/min)



Die drei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lymphozytenaktivität auf Concanavalin A (25 μ g) signifikant voneinander. Die Reaktivität der Gruppe 2 ist am niedrigsten.

Abbildung 11: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf Concanavalin A. (12,5 µg)

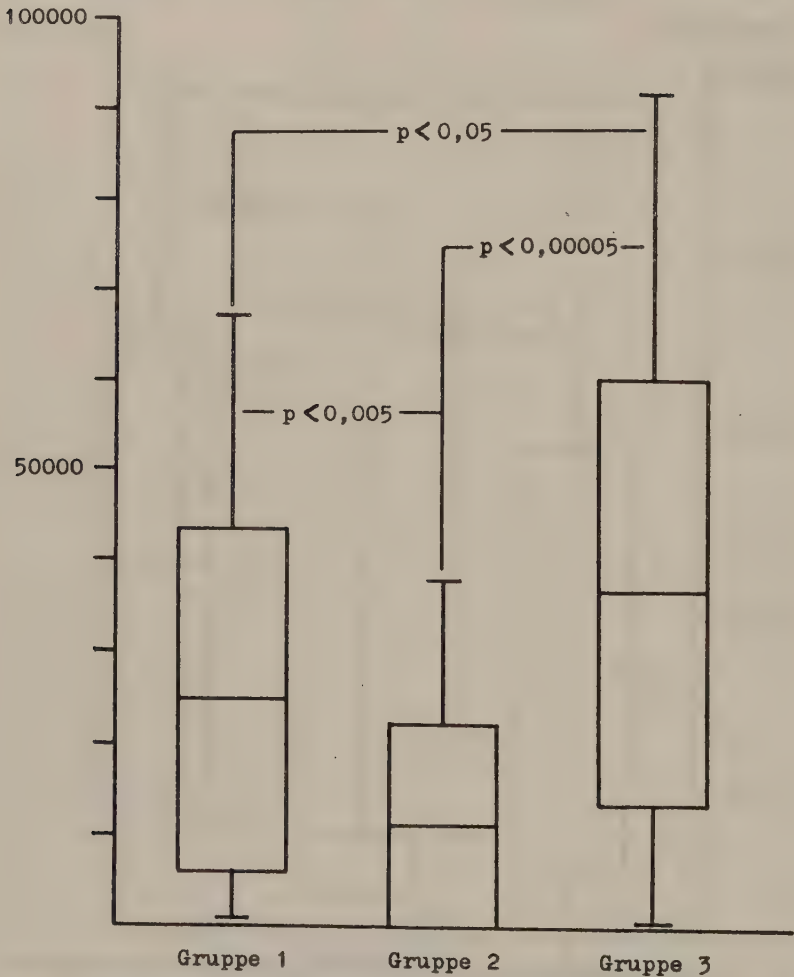
(Counts/min)



Die Lymphozytenreaktivität von Probanden der Gruppe 2 ist signifikant niedriger als die der beiden anderen Gruppen, die sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Abbildung 12: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf Pokeweed Mitogen.

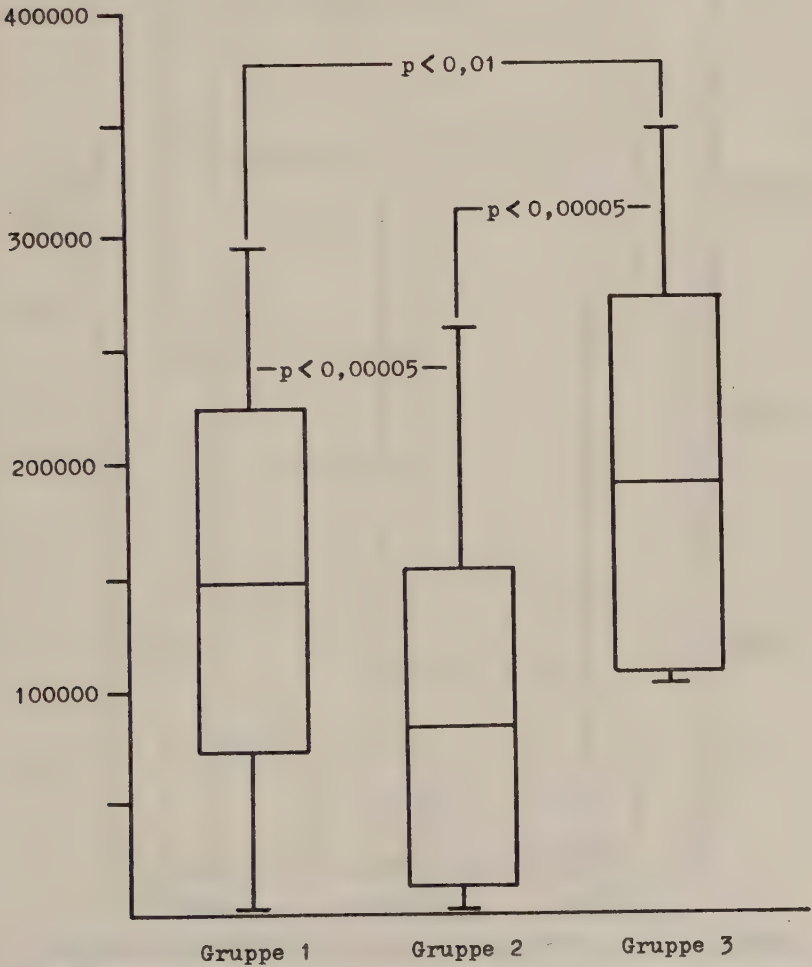
(Counts/min)



Die drei Gruppen unterscheiden sich signifikant hinsichtlich ihrer Lymphozytenreaktivität auf Pokeweed Mitogen, die in der Gruppe 2 am niedrigsten und in der Gruppe 3 am höchsten ist.

Abbildung 13: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf
Phytohämagglutinin

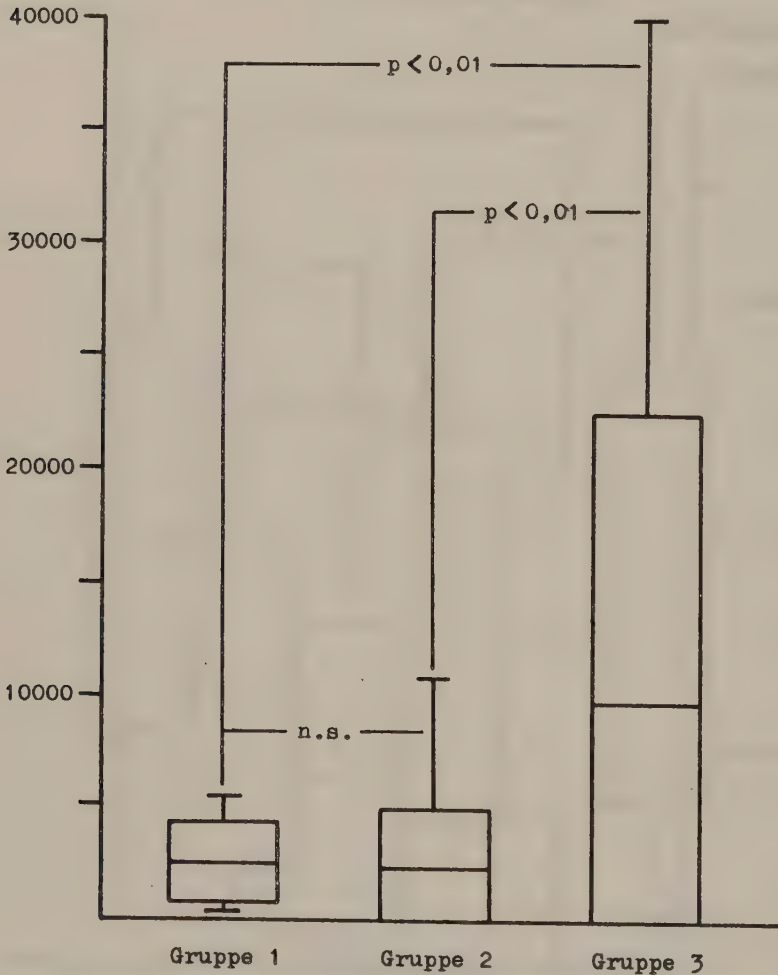
(Counts/min)



Die drei Gruppen unterscheiden sich signifikant hinsichtlich ihrer Lymphozytenreaktivität auf Phytohämagglutinin, die in der Gruppe 2 am niedrigsten und in der Gruppe 3 am höchsten ist.

Abbildung 14: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf Varidase

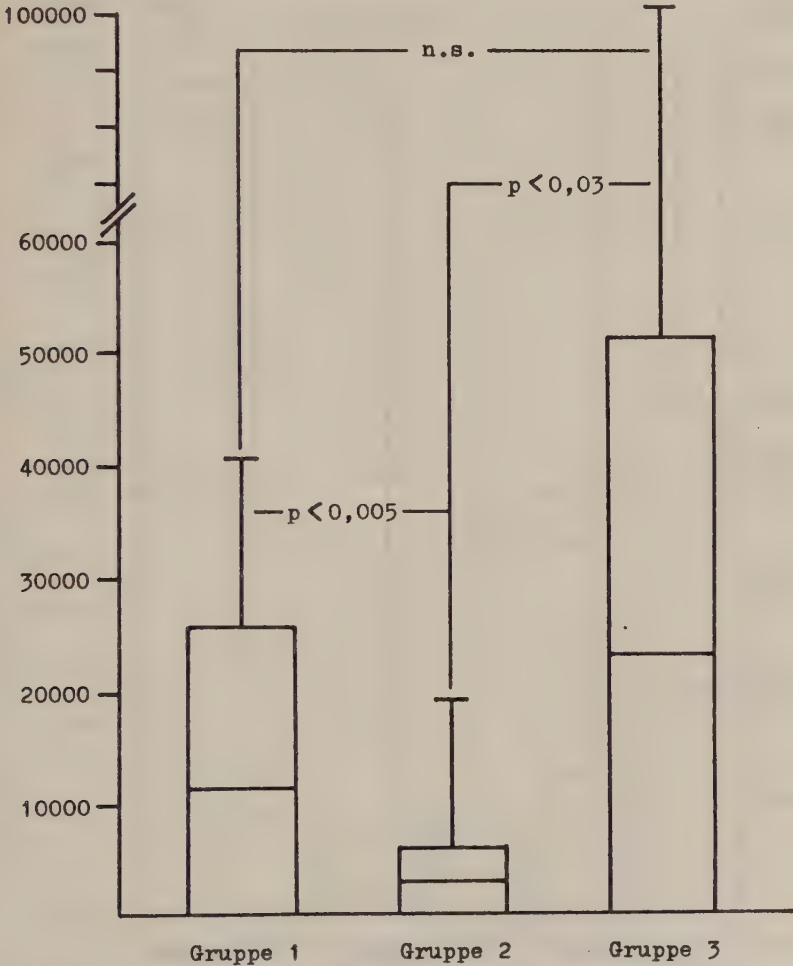
(Counts/min)



Lymphozyten von Probanden der Gruppe 3 reagieren signifikant höher auf Varidase als die von Probanden der anderen beiden Gruppen, die sich in ihrer Reaktivität nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Abbildung 15: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf Tetanustoxoid

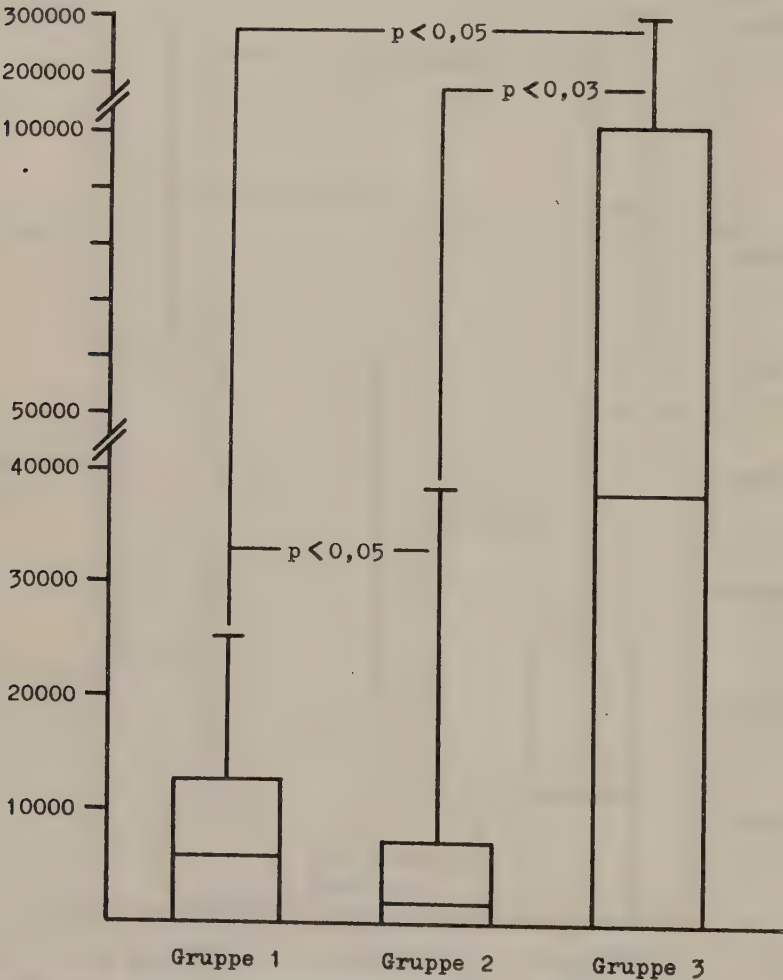
(Counts/min)



Die Lymphozytenreaktivität der Gruppe 2 ist in diesem Testsystem signifikant niedriger als die der beiden anderen Gruppen, die sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Abbildung 16: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf Diphtherietoxoid

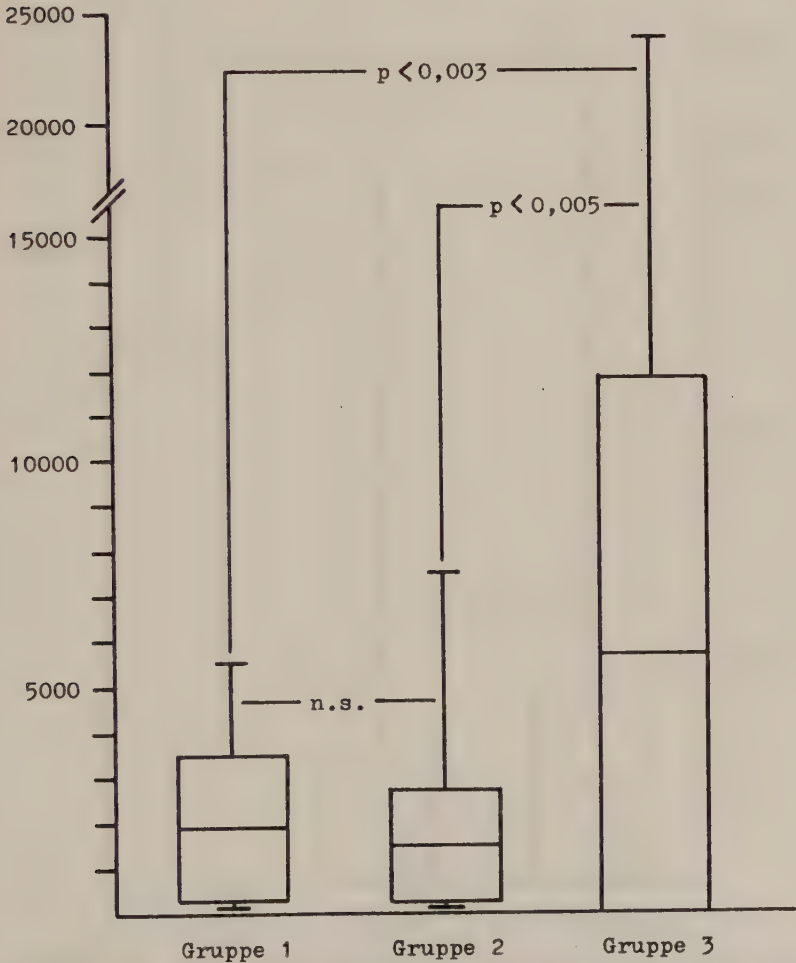
(Counts/min)



Die drei Gruppen unterscheiden sich in ihrer Lymphozytenreaktivität auf Diphtherietoxoid signifikant, wobei die Reaktivität in der Gruppe 2 am niedrigsten und in der Gruppe 3 am höchsten ist.

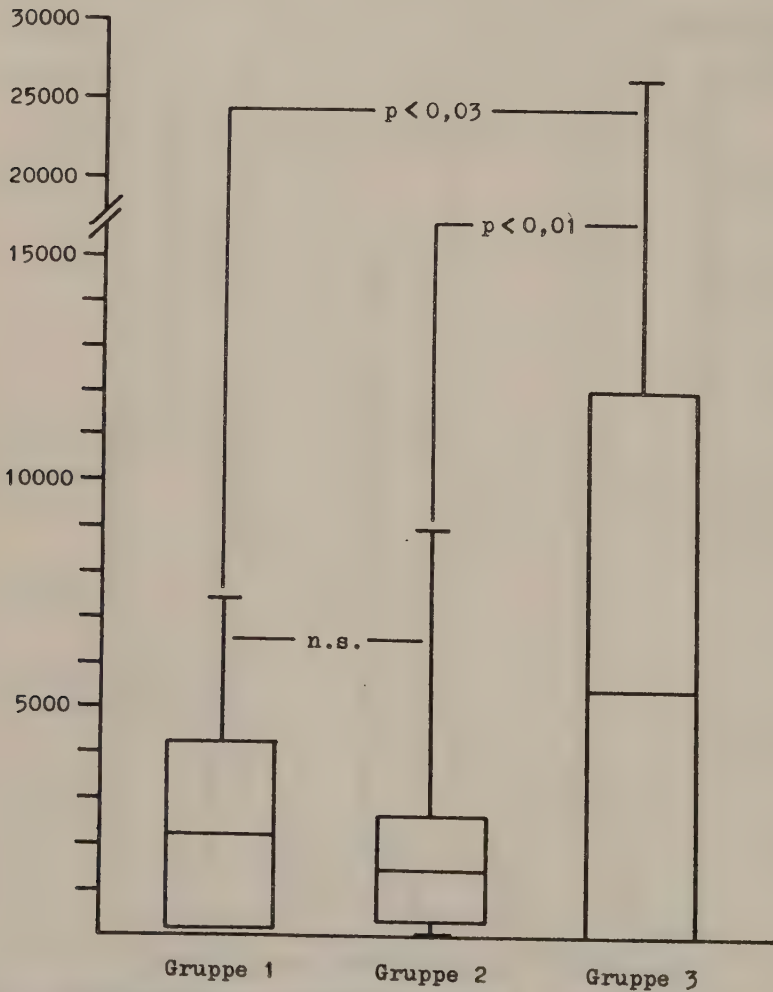
Abbildung 17: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf
Tuberkulin GT 1

(Counts/min)



Die Lymphozyten von Probanden der Gruppe 3 reagieren signifikant höher auf Tuberkulin GT 1 als die von Probanden der beiden anderen Gruppen, die sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

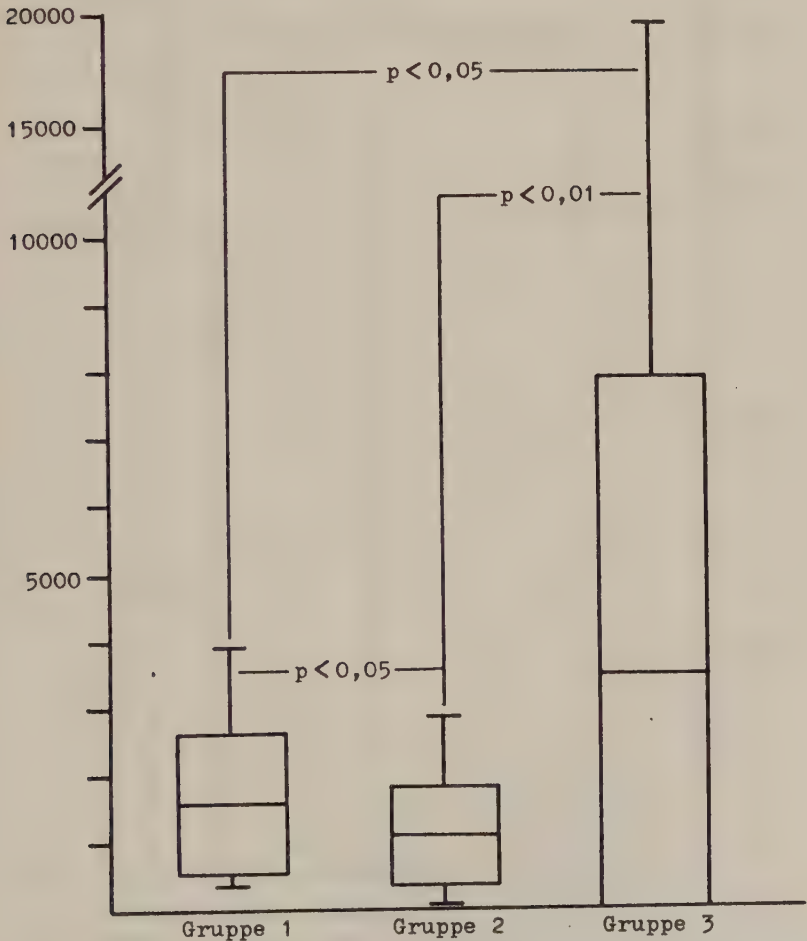
Abbildung 18: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf
Tuberkulin GT 10
(Counts/min)



Die Lymphozytenreaktivität der Gruppe 3 ist signifikant höher als die der beiden anderen Gruppen, die sich hinsichtlich ihrer Reaktivität auf Tuberkulin GT 10 nicht signifikant unterscheiden.

Abbildung 19: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf Masernantigen

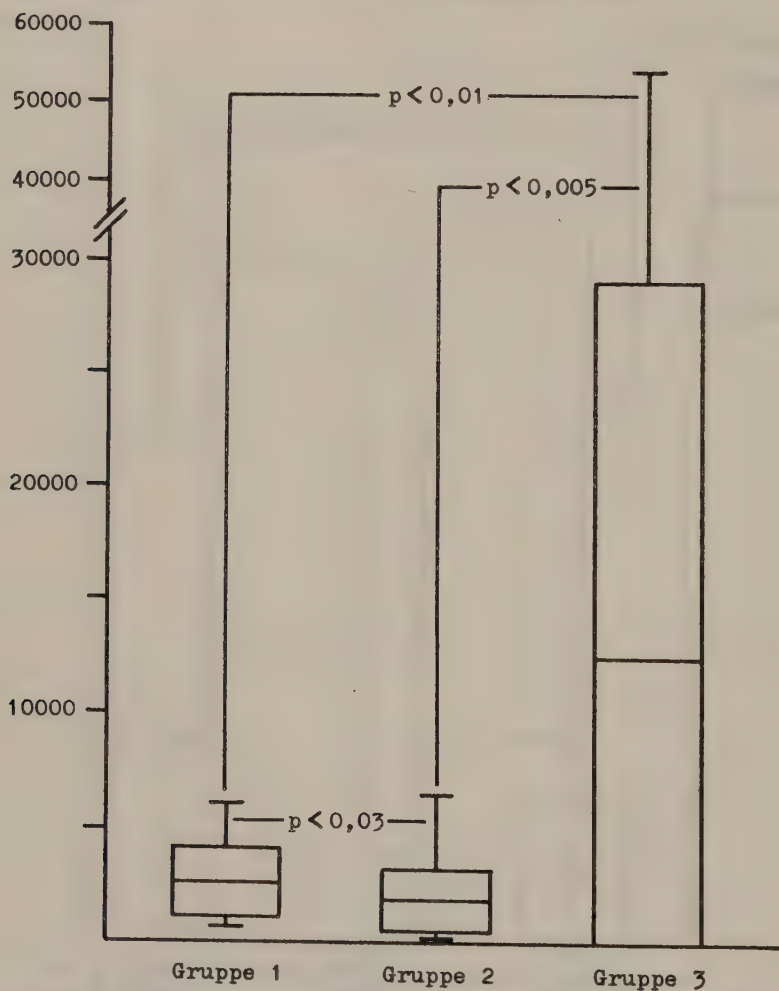
(Counts/min)



Die drei Gruppen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lymphozytenreaktivität auf Masernantigen signifikant voneinander. Die Reaktivität ist in der Gruppe 2 am niedrigsten und in der Gruppe 3 am höchsten.

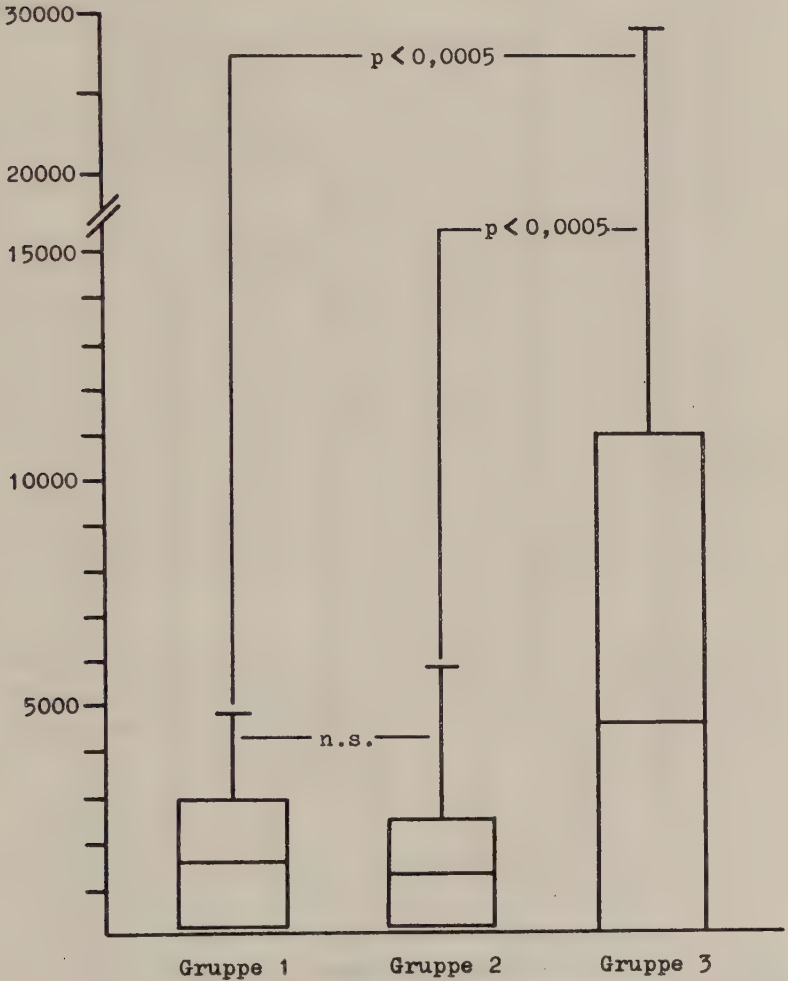
Abbildung 20: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf Vacciniaantigen

(Counts/min)



Die drei Gruppen unterscheiden sich in ihrer Lymphozytenreaktivität auf Vacciniaantigen signifikant voneinander. Die Reaktivität ist in der Gruppe 2 am niedrigsten und in der Gruppe 3 am höchsten.

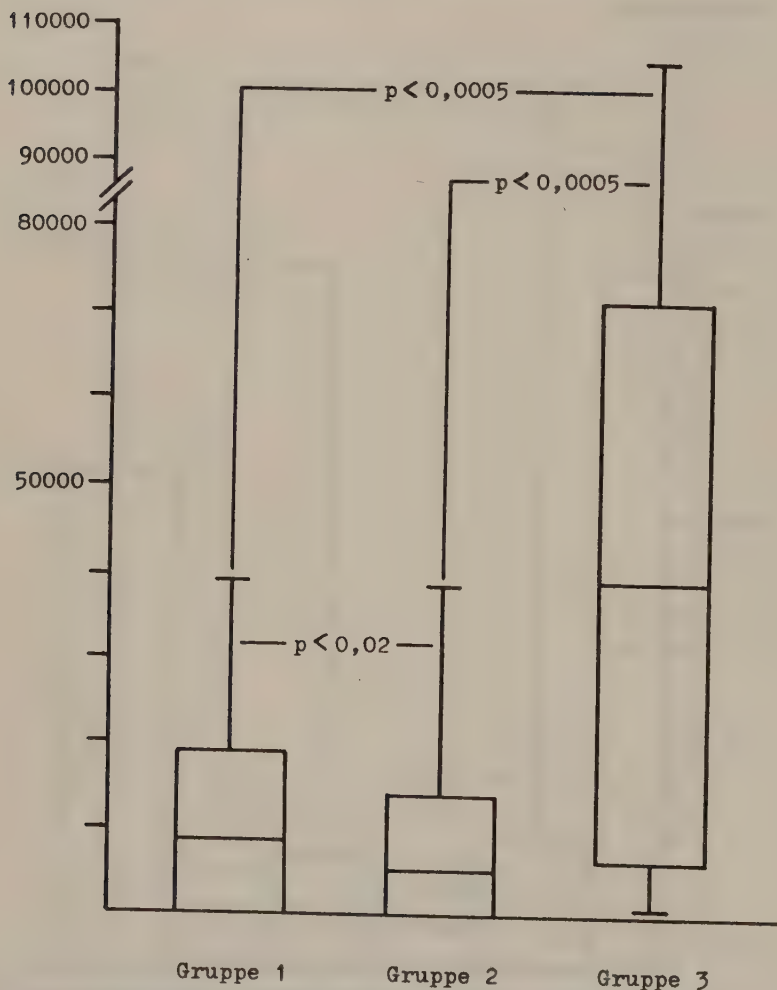
Abbildung 21: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf
Rötelnantigen
(Counts/min)



Die Lymphozyten von Probanden der Gruppe 3 reagieren signifikant höher auf Rötelnantigen als die von Probanden der beiden anderen Gruppen, die sich nicht signifikant voneinander unterscheiden.

Abbildung 22: Kontrollcluster - Lymphozytäre Reaktion auf Antigencocktail

(Counts/min)



Die drei Gruppen unterscheiden sich signifikant hinsichtlich ihrer Lymphozytenreaktivität auf den Antigencocktail. Die Reaktivität ist in Gruppe 2 am niedrigsten und in Gruppe 3 am höchsten.

Tabelle 13: Kontrollcluster - Suppressorzellaktivität

	Gruppe 1 (n = 18)		Gruppe 2 (n = 49)		Gruppe 3 (n = 21)	
Testsystem	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
SpA	27 %	36 %	36 %	41 %	29 %	41 %
PWM	29 %	38 %	32 %	40 %	53 %	35 %
PHA	41 %	37 %	26 %	35 %	36 %	34 %
MLC	63 %	33 %	51 %	37 %	62 %	29 %

Es besteht kein signifikanter Unterschied in der Suppressorzellaktivität zwischen den drei Kontrollclustern.

Abkürzungen: $\bar{x}$ = Mittelwert; SD = Standardabweichung; SpA = Protein A; PWM = Pokeweed Mitogen; PHA = Phytohämagglutinin; MLC = gemischte Lymphozytenkultur

Tabelle 14: Kontrollcluster - T-Zellsubpopulationen (absolute Zahl/ μ l und prozentualer Anteil).

	Gruppe 1 (n = 18)		Gruppe 2 (n = 49)		Gruppe 3 (n = 21)	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Lymphozyten	1967	491	2132	586	2279	621
T-Zellen	1092	378	1061	322	1027	465
T- Helferzellen	635	317	657	215	581	362
T-Suppressor-/ zytotox. T-Zellen	476	178	479	189	554	277
T-Zellen gesamt (OKT 3)	45 %	16 %	43 %	13 %	38 %	17 %
T-Helferzellen (OKT 4)	28 %	13 %	27 %	8 %	22 %	13 %
T-Suppressor-/ zytotox. T-Zellen (OKT 8)	20 %	7 %	19 %	8 %	21 %	9 %
OKT 4/OKT 8	1.4	0.9	1.4	0.7	1.0	0.6

Die Zahl der Lymphozyten, T-Zellen und deren Subpopulationen pro Mikroliter im peripheren Blut zeigt keine wesentlichen Unterschiede zwischen den drei Clustern.

Die relativen Anteile der T-Zellen und ihrer Subfraktionen sowie das OKT 4/8-Verhältnis zeigen ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede.

Abkürzungen: $\bar{x}$ = Mittelwert; SD = Standardabweichung

4.2.2. Diskussion

Die Clusteranalyse zeigt, daß unser Kontrollkollektiv aus drei Gruppen besteht, die sich immunfunktionell deutlich voneinander unterscheiden.

Über die Gruppenzugehörigkeit eines Probanden entscheiden bei der Multivarianzanalyse nicht einzelne Meßwerte, sondern die Summe aller zwischen den Clustern differenten Parameter, in unserer Untersuchung die vierzehn getesteten Mitogen- und Antigen-systeme. Die Zuordnung eines einzelnen Probanden beruht also nicht auf der Stärke der Stimulation durch einzelne Mitogene oder Antigene, sondern sie dürfte durch die allgemeine Reaktionsbereitschaft seiner Lymphozyten bedingt sein.

Die Reaktionsfähigkeit gegen Mitogene und Antigene kann entweder niedrig (Gruppe 2), mittelhoch (Gruppe 1) oder hoch (Gruppe 3) sein, wobei sich die Hochreagentengruppe 3 deutlicher von den beiden anderen Clustern unterscheidet als die Gruppen 1 und 2 untereinander.

Die übrigen von uns bestimmten Parameter (Suppressorzell-aktivität, absolute und relative Zahlen von Lymphozyten, T-Zellen und T-Zellsubpopulationen, OKT 4/OKT 8-Verhältnis) tragen nicht zur Diskriminierung der Cluster bei. Diese Tatsache läßt darauf schließen, daß die unterschiedliche Reaktionsbereitschaft der Lymphozyten funktionelle Ursachen hat.

Um die Relevanz und die statistische Validität der mit Hilfe der Clusteranalyse erhaltenen Ergebnisse zu überprüfen, wurden die Unterschiede zwischen den Mittelwerten der Cluster und der Gesamtvariabilität für alle getesteten Parameter im F-Test verglichen. Statistisch signifikante Unterschiede lagen bei allen Mitogen- und Antigen-systemen

vor. Dagegen war dies bei den Suppressorzellaktivitäten und den Lymphozytenzahlen und -subpopulationen nicht der Fall.

Die Überprüfung der Signifikanzen aller Einzeltestsysteme im t-Test führte zu den gleichen Ergebnissen. Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß zwischen den drei in der Clusteranalyse gefundenen Gruppen statistisch signifikante Unterschiede bestehen.

Eine gewisse Problematik unserer Analyse liegt darin, daß zur Bildung der Cluster und anschließend zur Prüfung der Unterschiede die Daten der gleichen Probanden verwendet wurden, also eine interne Validierung vorgenommen wurde. Da uns eine unabhängige Stichprobe für diese Überprüfung nicht zur Verfügung stand, teilten wir das Gesamtkollektiv nach der "jack knife"-Methode zufällig in zwei Teile. Bei dieser Methode wird mit dem einen Teil der Probanden die Clusteranalyse durchgeführt, deren Ergebnisse anschließend mit den Daten des anderen Teils in Diskriminanzanalysen validiert werden. Auch mit diesem Verfahren erhielten wir drei sich voneinander hochsignifikant unterscheidende Cluster, was als Bestätigung der Ergebnisse der Clusteranalyse für das gesamte Kontrollkollektiv gelten kann. Außerdem wurde damit die Reproduzierbarkeit des Verfahrens bewiesen.

Daraus folgt, daß innerhalb eines Kollektivs von gesunden Personen mindestens drei Gruppen existieren, die sich hinsichtlich der Funktion ihres Immunsystems deutlich voneinander unterscheiden. Ihr immunfunktionelles Verhalten könnte diese Gruppen möglicherweise zu Risikokollektiven für verschiedene Erkrankungen werden lassen.

4.3. Dilatative Kardiomyopathie:

4.3.1. Ergebnisse:

4.3.1.1. Mitogen- und Antigenstimulation:

Ein Vergleich der quantitativen Ergebnisse der Mitogen- und Antigenstimulationen zwischen Patienten (Tabelle 3 und 4) und den drei Clustern des Kontrollkollektivs (Tabelle 9 und 10) zeigte, daß die Lymphozyten der DCM-Patienten in 13 von 14 Testsystemen signifikant höher reagieren als die der Gruppe 2. In 6 Testsystemen lag die Lymphozytenreaktivität der Patientengruppe dagegen niedriger als die der Gruppe 3. Die größte Ähnlichkeit bestand zwischen der Patientengruppe und der Gruppe 1, wo nur in einem von 14 Testsystemen ein statistisch signifikanter Unterschied nachweisbar war (Tabelle 15). In ihrer lymphozytären Reaktion auf Stimulation durch Mitogene und Antigene verhielt sich die Patientengruppe also im wesentlichen analog zum Cluster 1, der die Mittelhochreagenten des Kontrollkollektivs umfaßt. In der Clusteranalyse wurden tatsächlich alle von uns untersuchten Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie diesem Cluster zugeordnet.

Tabelle 15: Mitogen- und Antigenstimulation - Statistische Signifikanzen der Unterschiede zwischen Kontrollclustern und dilatativer Kardiomyopathie (DCM).

Kardiomyopathie gegen	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
Testsystem	p <	p <	p <
Mitogene			
Protein A	n.s.	0.03	n.s.
Concanavalin A (25 ug)	n.s.	0.0005	n.s.
Concanavalin A (12.5 ug)	n.s.	0.0005	0.02
Pokeweed Mitogen	n.s.	0.0003	n.s.
Phytohämagglutinin	n.s.	0.0005	n.s.
Antigene			
Varidase	n.s.	0.03	n.s.
Tetanustoxoid	n.s.	0.05	n.s.
Diphtherietoxoid	n.s.	0.003	n.s.
Tuberkulin GT 1	n.s.	0.02	0.01
Tuberkulin GT 10	n.s.	0.03	n.s.
Masernantigen	n.s.	0.0005	0.05
Vacciniaantigen	n.s.	0.01	0.01
Rötelnantigen	n.s.	n.s.	0.05
Antigencocktail	0.01	0.0005	0.02

Die Lymphozytenreaktivität der DCM-Gruppe ist der des Mittelhochreagentenclusters 1 am ähnlichsten.

4.3.1.2. Suppressorzellaktivität

Die quantitativen Ergebnisse für die Patientengruppe sind der Tabelle 5, die der Kontrollcluster der Tabelle 13 zu entnehmen.

Die Suppressorzellaktivität der Patientengruppe war in der gemischten Lymphozytenkultur gegenüber allen drei Clustern höchst signifikant erniedrigt ($p < 0.00005$).

Im Pokeweed Mitogen-System fanden wir eine erniedrigte Suppressorzellaktivität im Vergleich zu den Clustern 2 (Niedrigreagenten) und 3 (Hochreagenten), während zum Mittelhochreagentencluster 1 kein Unterschied bestand.

Im Protein-A-System war die Suppressorzellaktivität der Patientengruppe gegenüber der des Niedrigreagentenclusters 2 signifikant vermindert, sie verhielt sich jedoch analog zu denen der beiden anderen Cluster.

Kein Unterschied zwischen den Suppressorzellaktivitäten von Patienten- und Kontrollgruppen war im PHA-System nachweisbar (Tabelle 16).

4.3.1.3. T-Zellsubpopulationen

Die quantitativen Ergebnisse der Patientengruppe sind aus der Tabelle 6 zu ersehen, die der Kontrollcluster aus der Tabellen 14.

Die absoluten Zahlen der Lymphozyten im peripheren Blut, der T-Zellen und ihrer Subpopulationen sowie die relativen Anteile der Zellkompartimente und das daraus berechnete OKT 4/OKT 8-Verhältnis zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen unserem Patientenkollektiv und den drei Kontrollclustern.

Dies bestätigt, wie schon im Vergleich mit dem gesamten Kontrollkollektiv deutlich wurde, daß diese Parameter bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie normal sind.

Tabelle 16: Suppressorzellaktivität (%) - Signifikanz der Unterschiede zwischen Kontrollclustern und Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie.

Kardiomyopathie gegen	Cluster 1	Cluster 2	Cluster 3
Testsystem	p <	p <	p <
Protein A	n.s.	0.01	n.s.
Pokeweed Mitogen	n.s.	0.02	0.0005
Phytohämagglutinin	n.s.	n.s.	n.s.
gemischte Lymphozytenkultur	0.0005	0.00005	0.00005

Die Gruppe der DCM-Patienten zeigt eine gegenüber den Kontrollclustern erniedrigte Suppressorzellaktivität, wobei die Unterschiede zum Mittelhochreagentencluster 1 am geringsten sind.

4.3.2. Diskussion

Im Gegensatz zu den konventionellen mathematischen Methoden, die Gruppen miteinander vergleichen, können mit Hilfe der Clusteranalyse einzelne Probanden einer Gruppe zugeordnet oder von ihr unterschieden werden.

Alle von uns untersuchten Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurden in der Clusteranalyse dem Mittelhochreagen-tencluster 1 zugeordnet.

Den einzigen Unterschied zu den gesunden Probanden, die diesem Clusterangehören, stellt die signifikant erniedrigte Suppressorzellaktivität dar.

Analoge Ergebnisse brachte auch eine Untersuchung von Myokarditispatienten, was auf eine immunfunktionelle Ähnlichkeit zwischen Myokarditis und dilatativer Kardiomyopathie hinweist (53).

Als Risikogruppe für diese Erkrankungen könnten also diejenigen Angehörigen des Clusters 1 angesehen werden, die eine niedrige Suppressorzellaktivität aufweisen.

Die verminderte Suppressorzellaktivität könnte Ausdruck einer Störung oder einer möglicherweise genetisch determinierten Variante des Immunsystems sein, die zu einer inadäquaten Immunreaktion führt. Auf diese Weise könnte durch eine überschießende Abwehrreaktion des Immunsystems im Verlauf einer Virusmyokarditis eine Autoaggressionserkrankung entstehen, die schließlich zur dilatativen Kardiomyopathie führt.

Die Hypothese von Fudenberg (63), daß allen Autoaggressionskrankheiten eine genetisch determinierte Störung einer Lymphozytenpopulation, nämlich der T-Suppressorzellen zugrunde liegt, wurde durch unsere Ergebnisse unterstützt. Die von Fudenberg angenommene genetische Disposition scheint jedoch erst durch den Kontakt des Immunsystems mit bestimmten

Agentien pathogenetisch wirksam zu werden.

Nun stellt sich die Frage, ob durch Anwendung der Clusteranalyse die Diagnostik der dilatativen Kardiomyopathie und die Auswahl der Patienten für eine adäquate Therapie verbessert werden können.

Der besondere Wert der Clusteranalyse liegt, wie bereits erwähnt, in der Möglichkeit, einzelne Probanden einer bestimmten Gruppe zuzuordnen.

Da alle von uns untersuchten Patienten dem Cluster 1 zugeordnet werden konnten, der durch eine mittelhohe lymphozytäre Reaktion auf Stimulation durch Mitogene und Antigene gekennzeichnet ist, könnte dieses Merkmal neben den bereits bekannten Kriterien (positive Myokardbiopsie, erniedrigte Suppressorzellaktivität) ebenfalls auf das Vorliegen einer Autoaggressionskrankheit hinweisen und eine immunsuppressive Therapie dieser prognostisch ungünstigen Erkrankung in Erwägung ziehen lassen.

5. Zusammenfassende Diskussion der Ergebnisteile 1 und 2

Die dilatative Kardiomyopathie weist, wie unsere Untersuchungen zeigen, ein charakteristisches lymphozytäres Reaktionsverhalten in vitro auf, welches die Abgrenzung dieser Erkrankung gegenüber ähnlichen Krankheitsbildern mit relativ einfachen immunologischen Methoden erlaubt.

Der im Ergebnisteil 1 dargestellte Befund einer erniedrigten Suppressorzellaktivität bei Patienten mit DCM im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv wird durch die Ergebnisse der Clusteranalyse im Teil 2 bestätigt. Darüber hinaus führt die Multivarianzanalyse zu der durch weitere statistische diskriminanzanalytische Methoden abgesicherten Erkenntnis, daß sich unter unseren 88 gesunden Probanden drei Gruppen deutlich voneinander unterscheiden lassen. Jede dieser drei

durch ihre lymphozytäre Reaktion gegen Mitogene und Antigene charakterisierte Gruppen ist bezüglich dieser Parameter in sich homogen, jedoch hoch different gegenüber den beiden anderen Gruppen.

Da die Zuordnung eines Probanden zu einem Cluster (= Gruppe) von der Übereinstimmung der Reaktion in vierzehn Mitogen- und Antigentestsystemen abhängt, kann dies als Ausdruck einer allgemeinen Reaktionsfähigkeit oder Reaktionsbereitschaft der Lymphozyten angesehen werden. Da die absoluten Zahlen und die relativen Anteile der Lymphozyten und ihrer Subpopulationen in allen Clustern fast gleich sind, dürften demnach die Unterschiede in der Stärke der Immunreaktion funktionelle Ursachen haben.

Wir fanden einen großen Cluster von niedrig reagierenden Probanden sowie zwei kleinere Cluster mit mittelhoher und hoher Reaktivität innerhalb unseres Normalprobandenkollektivs. Alle von uns untersuchten Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurden in der Clusteranalyse dem mittelhoch reagierendem Cluster zugeordnet, wobei sie sich von dieser Gruppe nur durch eine niedrige Suppressorzellaktivität unterscheiden.

Die Problematik der Übertragung von In-vitro-Befunden auf die Verhältnisse wurde bereits an anderer Stelle diskutiert (siehe 3.4.).

Unter der Annahme, daß die in unserer Untersuchung nachgewiesene niedrige Suppressorzellaktivität bei DCM-Patienten tatsächlich vorliegt, deutet dieser Befund in Zusammenhang mit dem Nachweis verstärkter Immunglobulinbindung an Herzmuskelgewebe auf ein autoaggressives Geschehen hin (17, 18, 53).

Niedrige Suppressorzellaktivität, die von Fowles (63) als

Ursache aller Autoaggressionskrankheiten angenommen wurde, konnte inzwischen bei autoaggressiven Prozessen nachgewiesen werden (20, 82).

Für die Beteiligung autoaggressiver Mechanismen bei einem Teil der entzündlichen Herzmuskelerkrankungen sprechen auch die bisherigen Erfahrungen mit immunsuppressiver Behandlung dieser Krankheiten. Zwar gelang es, Myokarditiden mit einer derartigen Therapie zum Abheilen zu bringen (101, 163), was in diesen Fällen auf eine Autoaggression hindeutet, andererseits wurden auch in einigen Fällen ungünstige Einflüsse von Immunsuppressiva auf den Krankheitsverlauf beobachtet (101), die wahrscheinlich aus der Unterdrückung normaler Abwehrreaktionen des Körpers gegen eine Virusinfektion resultierten. Deshalb wurde eine Unterscheidung zwischen Herzmuskelerkrankungen mit niedriger Suppressorzellaktivität, denen möglicherweise eine Autoaggression gegen Myokardgewebe zugrunde liegt, und anderen, vom klinischen Bild her ähnlichen Krankheiten gefordert (47).

Die Feststellung einer niedrigen Suppressorzellaktivität könnte also die Entscheidung für den Einsatz immunsuppressiver Medikamente erleichtern.

Unsere Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie hatten hinsichtlich der immunologischen Parameter sehr große Ähnlichkeit mit Patienten, die an Myokarditis erkrankt waren, was ein weiterer Hinweis auf die Gemeinsamkeiten in der Pathogenese beider Erkrankungen war. Der Versuch einer immunsuppressiven Therapie könnte demnach auch bei der dilatativen Kardiomyopathie mit niedriger Suppressorzellaktivität, wenn also wahrscheinlich eine Autoaggressionskrankheit vorliegt, erfolgversprechend sein.

Der Vorteil der Clusteranalyse gegenüber den konventionellen statistischen Methoden liegt in der Möglichkeit, Aussagen über die Zuordnung einzelner Probanden zu treffen. Wenn nun,

wie in unserer Untersuchung, alle Patienten dem Mittelhochreagentencluster zugeordnet werden können, so ist das als Beweis für die große immunfunktionelle Ähnlichkeit sowohl der Patienten untereinander wie auch zwischen Patienten und den Kontrollprobanden dieses Clusters zu werten. Neben der Bestätigung für die harten Eingangskriterien unserer Studie kann aufgrund dieser Ergebnisse der Schluß gezogen werden, daß die gesunden Personen des Clusters 1, insbesondere die mit einer niedrigen Suppressorzellaktivität, möglicherweise ein besonderes Risiko hinsichtlich autoaggressiver Myokard-erkrankungen tragen.

IMMUNGENETISCHER ANHANG

6. Hinweis auf eine genetische Determination der Immunfunktion beim Menschen

6.1. Einleitung

6.1.1. Allgemeines

Als eine der Ursachen für die Resistenz gegenüber Erregern, die für andere Spezies pathogen sind, sowie für unterschiedliche Krankheitsverläufe bei Angehörigen verschiedener Rassen werden seit langem auch genetische Faktoren diskutiert. Im Tierexperiment konnte eine genetisch determinierte Kontrolle der Immunreaktion bei einigen Tierarten bereits nachgewiesen werden (11).

6.1.2. Ir-Gene

Untersuchungen an Meerschweinchen zeigten, daß durch definierte Antigene bei Tieren aus verschiedenen Inzuchtstämmen unterschiedlich starke Immunreaktionen hervorgerufen werden (16, 92). Das führte zu der These, daß beim Meerschweinchen die Immunantwort von bestimmten Genen, den sogenannten Ir-Genen (Ir = immune response) kontrolliert wird. Sind im Genom eines Inzuchtstammes die entsprechenden spezifischen Ir-Gene vorhanden, dann kommt es bei Antigenkontakt zu einer deutlichen Immunreaktion, die Tiere sind also "high responder". Fehlen die spezifischen Ir-Gene jedoch, dann zeigen die Tiere keine oder nur schwache Reaktionen ("low responder").

Zu ähnlichen Ergebnissen führten auch Untersuchungen an Mäusen (119), Ratten (4, 78) und Rhesusaffen (39). Bei der Maus werden die Immunreaktionen zumindest gegen einige Antigene durch zwei komplementäre Ir-Gene gesteuert, die beide vorhanden sein müssen, um eine Reaktion zu ermöglichen. Die Immunantwort bleibt aus, wenn eines der beiden Gene fehlt (40, 128, 133, 213).

Genprodukte der Ir-Gene sind Ia-Antigene, die auf der Oberfläche von B-Lymphozyten und Makrophagen mit spezifischen Antikörpern nachweisbar sind (7, 103). Die Ia-Antigene sind Glykoproteine, die aus je einer Alpha- und Beta-Kette (Molekulargewicht 30000 bzw. 28000) zusammengesetzt sind (11).

Die Ir-Gene aller untersuchten Tierspezies befinden sich in enger räumlicher Beziehung zu den Histokompatibilitätsgenen, welche für die Abstoßungsreaktion des Körpers gegen transplantiertes Fremdgewebe verantwortlich sind. Auch der Mensch besitzt Histokompatibilitätsgene, die Existenz von Ir-Genen konnte bisher nicht bewiesen werden.

6.1.3. Der Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)

Die Histokompatibilitätsgene liegen auf einem relativ kurzen Chromosomenabschnitt dicht beisammen. Dieser Abschnitt wird beim Menschen als Haupthistokompatibilitätskomplex, bei der Ratte als H-1-Komplex und bei der Maus als H-2-Komplex bezeichnet (13, 123, 134).

Genprodukte von Histokompatibilitätsgenen im H-2-Komplex sind auf fast allen Körperzellen der Maus nachweisbar (7, 103). Die entsprechenden Oberflächenantigene beim Menschen wurden zuerst auf Leukozyten gefunden und deshalb als humane Leukozytenantigene (HLA-Antigene) bezeichnet (29, 30). Inzwischen kann eine große Zahl von HLA-Antigenen mit Hilfe lymphozytotoxischer Methoden unterschieden werden (13, 102). Die HLA-Gene bilden den MHC des Menschen, der auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nr.6 liegt (61, 111, 121, 186).

6.1.4. Das HLA-System

6.1.4.1. Klasse-I-Antigene

Innerhalb des MHC auf dem kurzen Arm des Chromosoms Nr.6 liegt je ein HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Locus. Jede Zelle mit

einem diploiden Chromosomensatz besitzt also je zwei dieser Loci, die zusammen einen Haplotyp bilden und gemeinsam vererbt werden. Auf jedem Locus ist eines von mehreren möglichen Allelen vorhanden. Befindet sich auf beiden Chromosomen Nr. 6 einer Zelle das gleiche Allel, dann ist das Individuum homozygot. Entsprechend wird das Individuum als heterozygot bezeichnet, wenn zwei verschiedene Allele vorhanden sind. Die Allele werden mit Zahlen bezeichnet, z.B. HLA-A 2, HLA-B 7, HLA-CW 1.

Die HLA-Antigene, die auf der Oberfläche praktisch aller Körperzellen mit Ausnahme der Erythrozyten nachweisbar sind, setzen sich aus Genprodukten dieser Allele, das sind Glykoproteine mit einem Molekulargewicht von etwa 45000, und dem Beta-2-Mikroglobulin, einem Protein mit einem Molekulargewicht von 12000, zusammen (134). Diese sogenannten Klasse-I-Antigene scheinen für die Erkennung körpereigenen Gewebes von großer Bedeutung zu sein (104).

6.1.4.2. Klasse-II-Antigene

Die Reaktion von Lymphozyten zweier Probanden in der gemischten Lymphozytenkultur (MLC) wird nicht durch die klassischen HLA-Gene gesteuert. In Familienuntersuchungen konnte gezeigt werden, daß die Stimulation, die zu einer Umwandlung der Lymphozyten in Blasten führt, auf Unterschiede in einem weiteren Locus des MHC, dem HLA-D-Locus, zurückzuführen ist (2, 125, 126, 127, 171, 172, 177, 212).

Mit dem HLA-D-Locus möglicherweise identisch, auf jeden Fall aber sehr eng gekoppelt ist der HLA-Dr-Locus, dessen Genprodukte die HLA-Dr-Antigene sind. Diese auch als Klasse-II-Antigene bezeichneten Glykoproteine haben ein Molekulargewicht von 62000 und unterscheiden sich biochemisch von den Klasse-I-Antigenen (107, 184, 204, 211). HLA-Dr-Antigene sind auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Langerhans-

schen Zellen und Epithelialzellen nachweisbar (178). In ihrer Funktion entsprechen sie im wesentlichen den Genprodukten der I-Region des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Maus. Sie sind an der Kooperation zwischen den verschiedenen Zellen des Immunsystems beteiligt, etwa bei der Steuerung der Antikörpersynthese durch Plasmazellen oder bei der Präsentation von Fremdanthigenen durch Makrophagen. Eine Kooperation bei der Immunantwort ist nur dann möglich, wenn die beteiligten Zellen mindestens ein identisches HLA-Dr-Antigen besitzen (12, 95, 96, 134, 220).

7.1.5. Fragestellung

Innerhalb unseres Kontrollkollektivs hatten wir drei hinsichtlich ihrer Immunfunktion unterschiedliche Gruppen gefunden. Die Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie konnten ausnahmslos dem Cluster der Mittelhochreagenten zugeordnet werden. Die wichtige Rolle, welche die Klasse-I- und Klasse-II-Antigene bei der Auslösung und Steuerung von Immunreaktionen spielen, veranlaßte uns zu untersuchen, ob die immunfunktionell differenten Gruppen auch Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung der einzelnen HLA-Gene aufzuweisen haben. Angesichts des enormen Polymorphismus des HLA-Systems konnten wir bei den relativ geringen Probandenzahlen unserer Gruppen von vornherein nicht mit statistisch signifikanten Ergebnissen rechnen, sondern allenfalls Hinweise auf mögliche Verknüpfungen zwischen Genen des MHC und immunfunktionellen Parametern erwarten.

Die Klasse-I-Antigene wurden bei Kontrollprobanden und Patienten im Mikrozytotoxizitätsassay nach Terasaki bestimmt (102, 192). Bei einem Teil des Kontrollkollektivs wurden auch die Klasse-II-Antigene festgestellt.

6.2. Mathematische Methoden

Zunächst wurde die prozentuale Verteilung der einzelnen HLA-Gene in den verschiedenen Gruppen berechnet. Zur Bestimmung des relativen Risikos (rR) für die Zugehörigkeit eines Probanden zu einer Gruppe auf Grund des gehäuften Auftretens bestimmter HLA-Gene in dieser Gruppe bedienten wir uns folgender Formel:

$$\text{Relatives Risiko (rR)} =$$

$$\frac{\text{Zahl der positiven Probanden} \times \text{Zahl der negativen Kontrollen}}{\text{Zahl der positiven Kontrollen} \times \text{Zahl der negativen Probanden}}$$

Als Kontrollkollektiv diente bei der Patientengruppe das gesamte Normalprobandenkollektiv, während bei der Untersuchung der drei Cluster jeweils die beiden anderen Cluster gemeinsam als Kontrollgruppe verwendet wurden.

In unserer Untersuchung war das relative Risiko ein Maß für die Stärke der Assoziation eines HLA-Gens zu einer der Probanden- bzw. Patientengruppen. Allgemein spricht man von einer positiven Assoziation, wenn das relative Risiko Werte größer/gleich 1 annimmt, von einer negativen Assoziation bei einem Wert kleiner 1. Eine biologische Signifikanz wird bei einem rR-Wert größer/gleich 2 angenommen.

Anschließend wurde geprüft, ob auch Kombinationen der innerhalb einer Gruppe biologisch signifikant vermehrten HLA-Gene bei Angehörigen dieser Gruppe gehäuft vorhanden waren. Auch für diese Genkombinationen wurden prozentuale Häufigkeiten in jeder der Gruppen und das relative Risiko für die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Gruppe berechnet. Es folgte ein Vergleich zwischen den drei Kontrollclustern untereinander sowie zwischen den Clustern und der Patientengruppe hinsichtlich der biologischen signifikant vermehrten HLA-

Gene und Genkombinationen.

Mit dem "exakten Fisher-Test" wurde die mathematische Signifikanz für die biologisch signifikant vermehrten Einzelgene überprüft. Bei unserer, angesichts des Polymorphismus des HLA-Systems relativ geringen Anzahl von Probanden, übertreffen die mit diesem Verfahren nachgewiesenen mathematischen Signifikanzen in ihrer Aussagekraft kaum die der biologischen Signifikanzen des relativen Risikos. Wegen dieser eingeschränkten Aussagefähigkeit der statistischen Methode versuchten wir, die einzelnen Probanden über ihr individuelles HLA-Muster in die durch die Clusteranalyse definierten Gruppen zu reklassifizieren. Ziel dieses Versuchs war es, festzustellen, ob mit Hilfe genetischer Parameter überzufällig häufig eine richtige Zuordnung der Probanden zu ihrem immunfunktionell definiertem Cluster möglich war (in diesem Fall mehr als 33 % der Probanden).

6.3. Ergebnisse

6.3.1. Kontrollkollektiv

Die prozentuale Verteilung der HLA-Gene im gesamten Kontrollkollektiv geht aus der Tabelle 17 hervor.

6.3.2. Cluster

6.3.2.1. Cluster 1 (Mittelhochreagenten)

Eine biologische signifikante positive Assoziation zum Cluster 1 zeigten folgende HLA-Gene:

A 28 ($rR = 2.8$), Aw 30/31 ($rR = 4.3$), B 12 ($rR = 2.0$), B 13 ($rR = 2.6$), B 27 ($rR = 2.0$), Bw 53 ($rR = 4.1$), Cw 2 ($rR = 4.0$), Cw 5 ($rR = 2.0$) und Cw 6 ($rR = 3.8$).

Statistisch signifikant ($p < 0.05$) war diese Beziehung für die Gene Aw 30/31 und Bw 53 (siehe Tabelle 18).

Kombinationen von je zwei der oben genannten Gene fanden sich im Cluster 1 in 33 % der Fälle ($rR = 12.0$), im Cluster

2 in 6 % der Fälle ($rR = 0.34$) und bei keinem Probanden des Clusters 3 ($rR = 0.0$). Im exakten Fisher-Test wurde dieser Trend zur Häufung der Genkombinationen im Cluster 1 bestätigt ($p < 0.005$), wobei die Signifikanz auch in der Yeat-Korrektur erhalten blieb.

40 % der Angehörigen des Clusters 1 konnten auf Grund ihres HLA-Musters richtig reklassifiziert werden.

6.3.2.2. Cluster 2 (Niedrigreagenten)

Für folgende HLA-Gene war das relative Risiko, das die positive Assoziation dieser Gene zum Cluster 2 ausdrückt, biologisch signifikant erhöht:

A 9 ($rR = 2.9$), B 14 ($rR = 4.4.$), Bw 15 ($rR = 2.1$), Bw 16 ($rR = 7.0$), Bw 18 ($rR = 2.1$), Bw 22 ($rR = 2.5$) und Bw 37 ($rR = 2.5$) (siehe Tabelle 19).

Eine statistische Signifikanz dieser Beziehung, die auch in der Yeat-Korrektur erhalten blieb, war für das Gen Bw 16 nachweisbar. Zweierkombinationen der genannten HLA-Gene fanden wir im Cluster 2 in 20 % der Fälle ($rR = 9.7$). Im Cluster 1 traten diese Kombinationen in 6 % der Fälle auf ($rR = 0.4$) und im Cluster 3 überhaupt nicht ($rR = 0.0$). Das gehäufte Auftreten dieser Genkombinationen im Cluster 2 war statistisch signifikant ($p < 0.03$).

50 % der Angehörigen des Clusters 2 konnten auf Grund ihrer HLA-Gene richtig reklassifiziert werden.

6.3.2.3. Cluster 3 (Hochreagenten)

Eine positive Assoziation zum Hochreagentencluster 3 ergab die Berechnung des relativen Risikos für die folgenden HLA-Gene:

B 5 ($rR = 3.2$), B 8 ($rR = 5.0$), B 13 ($rR = 2.1$), BW 21 ($rR = 3.4$), Cw 1 ($rR = 3.4$) und Cw 7 ($rR = 3.3$) (siehe Tabelle 20). Die statistische Abstützung dieses Trends im exakten Fisher-Test gelang für die Gene B 5 ($p < 0.03$) und B 8 ($p < 0.05$).

Kombinationen der vermehrt vorkommenden Gene fanden wir in 24 % der Fälle im Cluster 3 ($rR = 21.0$). Dagegen lagen solche Kombinationen bei keinem Probanden der Cluster 1 und 2 vor ($rR = 0.0$). Die statistische Signifikanz dieser Beziehung bleibt auch in der Yeat-Korrektur erhalten.

70 % der Probanden des Clusters 3 konnten in der Reklassifikationsanalyse auf Grund ihrer HLA-Gene richtig der immunfunktionell definierten Hochreagentengruppe 3 zugeordnet werden.

6.3.3. Dilatative Kardiomyopathie

Die HLA-Gene A 2 ($rR = 2.5$), A 10 ($rR = 2.7$), A 28 ($rR = 3.0$), B 12 ($rR = 2.0$), Bw 15 ($rR = 2.0$), Bw 17 ($rR = 2.0$), Cw 1 ($rR = 2.5$), CW 2 ($rR = 2.5$) und Cw 7 ($rR = 2.5$) zeigten biologisch signifikante Assoziationen zur Gruppe der DCM-Patienten (siehe Tabelle 21). Für das Gen A 2 ist dieser Trend auch statistisch signifikant ($p < 0.05$).

Kombinationen der im Patientenkollektiv vermehrt vorkommenden Gene fanden sich in 67 % der Fälle, während nur 27 % der Kontrollprobanden eine dieser Kombinationen besaßen ($rR = 5.3$). Im exakten Fisher-Test erwies sich dieser Unterschied auch in der Yeat-Korrektur als statistisch signifikant ($p < 0.005$).

Im Cluster 1 des Kontrollkollektivs waren die Kombinationen der in der Patientengruppe vermehrt vorkommenden Gene in 39 % der Fälle vorhanden. Der Unterschied zwischen diesem Cluster und der DCM-Gruppe war statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu fanden sich statistisch signifikante Unterschiede ($p < 0.005$) zwischen der Patientengruppe und den Cluster 2 und 3, wo die entsprechenden Genkombinationen nur jeweils in 24 % der Fälle vorlagen.

Tabelle 17: HLA-Genverteilung (%) im Gesamtkollektiv
(n = 88)

A 1	25 %	Cw 1	1 %
A 2	45 %	Cw 2	3 %
A 3	32 %	Cw 3	15 %
A 9	20 %	Cw 4	17 %
A 10	7 %	Cw 5	3 %
A 11	11 %	Cw 6	2 %
A 28	6 %	Cw 7	2 %
A 29	11 %	Cw -	95 %
Aw 30	5 %		
A -	41 %		
B 5	13 %	Dr 1	17 %
B 7	26 %	Dr 2	20 %
B 8	13 %	Dr 3	25 %
B 12	23 %	Dr 4	29 %
B 13	9 %	Dr 5	35 %
B 14	7 %	Dr 6	15 %
Bw 15	8 %	Dr 7	23 %
Bw 16	9 %	Dr 8	1 %
Bw 17	5 %	Dr -	32 %
Bw 18	8 %		
Bw 21	1 %		
Bw 22	3 %		
B 27	3 %		
Bw 35	22 %		
Bw 37	3 %		
Bw 40	16 %		
Bw 53	1 %		
B -	31 %		

Tabelle 18: HLA-Genverteilung (%) und relatives Risiko (rR)
im Cluster 1 (n = 18)

A 1	22 %	0.8	Cw 1	0 %	0.0
A 2	33 %	0.5	Cw 2	6 %	4.0
A 3	28 %	0.5	Cw 3	17 %	1.2
A 9	22 %	1.1	Cw 4	28 %	1.7
A 10	6 %	0.8	Cw 5	6 %	2.0
A 11	11 %	1.0	Cw 6	6 %	3.8
A 28	11 %	2.8	Cw 7	0 %	0.0
A 29	11 %	1.6	Cw -	89 %	1.1
Aw 30	11 %	4.3			
A -	44 %	1.2	Dr 1	10 %	0.6
			Dr 2	10 %	0.5
B 5	0 %	0.0	Dr 3	36 %	1.9
B 7	28 %	1.1	Dr 4	20 %	0.5
B 8	11 %	0.8	Dr 5	40 %	1.4
B 12	33 %	2.0	Dr 6	10 %	0.7
B 13	17 %	2.6	Dr 7	20 %	1.2
B 14	6 %	0.7	Dr 8	0 %	0.0
Bw 15	6 %	0.7	Dr -	50 %	1.9
Bw 16	0 %	0.0			
Bw 17	6 %	1.3			
Bw 18	6 %	0.6			
Bw 21	0 %	0.0			
Bw 22	0 %	0.0			
B 27	6 %	2.0			
Bw 35	22 %	1.0			
Bw 37	0 %	0.0			
Bw 40	17 %	1.1			
Bw 53	5 %	4.1			
B -	39 %	1.6			

Tabelle 19: HLA-Genverteilung (%) und relatives Risiko (rR)
im Cluster 2 (n = 49).

A 1	22 %	0.7	Cw 1	0 %	0.0
A 2	49 %	1.4	Cw 2	4 %	1.0
A 3	35 %	1.4	Cw 3	12 %	0.6
A 9	27 %	2.5	Cw 4	25 %	1.8
A 10	9 %	1.6	Cw 5	2 %	0.5
A 11	11 %	0.5	Cw 6	2 %	0.8
A 28	4 %	0.9	Cw 7	2 %	0.8
A 29	8 %	1.1	Cw -	97 %	0.7
Aw 30	2 %	0.3			
A -	37 %	0.6	Dr 1	15 %	0.8
			Dr 2	18 %	1.0
B 5	12 %	1.0	Dr 3	21 %	0.7
B 7	25 %	0.8	Dr 4	35 %	1.5
B 8	6 %	0.2	Dr 5	27 %	0.5
B 12	25 %	1.2	Dr 6	15 %	0.9
B 13	4 %	0.2	Dr 7	27 %	1.5
B 14	10 %	4.4	Dr 8	3 %	0.8
Bw 15	10 %	2.1	Dr -	41 %	2.0
Bw 16	16 %	7.0			
Bw 17	4 %	0.8			
Bw 18	10 %	2.1			
Bw 21	0 %	0.0			
Bw 22	6 %	2.5			
B 27	4 %	1.6			
Bw 35	18 %	0.7			
Bw 37	6 %	2.5			
Bw 40	14 %	0.8			
Bw 53	0 %	0.0			
B -	29 %	0.8			

Tabelle 20: HLA-Genverteilung (%) und relatives Risiko (rR)
im Cluster 3 (n = 21)

A 1	33 %	1.7	Cw 1	5 %	3.4
A 2	48 %	1.1	Cw 2	0 %	0.0
A 3	29 %	0.8	Cw 3	19 %	1.6
A 9	5 %	0.6	Cw 4	5 %	0.1
A 10	5 %	0.6	Cw 5	5 %	1.6
A 11	19 %	1.8	Cw 6	0 %	0.0
A 28	5 %	0.8	Cw 7	5 %	3.3
A 29	5 %	0.5	Cw -	95 %	1.0
Aw 30	5 %	1.1			
A -	48 %	1.4	Dr 1	27 %	1.9
			Dr 2	27 %	1.6
B 5	24 %	3.2	Dr 3	20 %	0.7
B 7	29 %	1.2	Dr 4	27 %	0.9
B 8	29 %	5.0	Dr 5	47 %	1.8
B 12	10 %	0.3	Dr 6	20 %	1.3
B 13	14 %	2.1	Dr 7	13 %	0.5
B 14	0 %	0.0	Dr 8	0 %	0.0
Bw 15	5 %	0.5	Dr -	14 %	0.3
Bw 16	0 %	0.0			
Bw 17	5 %	1.1			
Bw 18	5 %	0.5			
Bw 21	5 %	0.5			
Bw 22	0 %	0.0			
B 27	0 %	0.0			
Bw 35	29 %	1.7			
Bw 37	0 %	0.0			
Bw 40	19 %	1.3			
Bw 53	0 %	0.0			
B -	29 %	0.9			

Tabelle 21: HLA-Genverteilung (%) und relatives Risiko (rR)
bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie
(n = 36)

A 1	22 %	1.0	Cw 1	3 %	2.5
A 2	67 %	2.5	Cw 2	6 %	2.5
A 3	17 %	0.4	Cw 3	19 %	1.4
A 9	22 %	1.2	Cw 4	17 %	0.8
A 10	17 %	2.7	Cw 5	8 %	2.6
A 11	11 %	1.0	Cw 6	0 %	0.0
A 28	17 %	3.0	Cw 7	8 %	3.9
A 29	11 %	1.5	Cw -	86 %	0.3
Aw 30	0 %	0.0			
A -	17 %	0.3			
B 5	11 %	1.4			
B 7	33 %	1.4			
B 8	17 %	1.4			
B 12	36 %	2.0			
B 13	6 %	0.6			
B 14	4 %	0.4			
Bw 15	17 %	2.0			
Bw 16	8 %	0.9			
Bw 17	8 %	2.0			
Bw 18	6 %	0.7			
Bw 21	0 %	0.0			
Bw 22	3 %	1.7			
B 27	6 %	1.7			
Bw 35	8 %	0.3			
Bw 37	0 %	0.0			
Bw 40	8 %	0.5			
Bw 53	0 %	0.0			
B -	25 %	0.7			

6.4. Diskussion

Wie schon auf Grund des relativ geringen Stichprobenumfangs erwartet, konnte eine statistisch signifikante Häufung einzelner HLA-Gene in den Kontrollclustern bzw. im Patientenkollektiv nur in wenigen Fällen gefunden werden, obwohl die Berechnung des relativen Risikos eine biologisch signifikante Vermehrung einer Reihe von Genen in den einzelnen Gruppen anzeigt.

Dagegen unterschieden sich alle drei Cluster deutlich voneinander, wenn man die Häufigkeiten von Kombinationen der biologisch signifikant vermehrten HLA-Gene verglich. Hier waren die Differenzen sowohl biologisch ($rR = 2.0$) wie auch statistisch signifikant ($p < 0.05$). Auf der Grundlage der Genkombinationen unterschieden sich die immunfunktionell definierten Cluster also auch in genetischen Parametern. Allerdings bestanden solche genetischen Unterschiede nur hinsichtlich der HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Gene. Keines der HLA-Dr-Gene ließ eine Häufung in einem der drei Cluster erkennen.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse führten wir eine Reklassifikationsanalyse durch. Bei dieser computergestützten Methode wurde versucht, die Einzelprobanden anhand ihres HLA-Musters ihren immunfunktionellen Gruppen zuzuordnen. Dies gelang in 53 % der Fälle, während nach der Zufallswahrscheinlichkeit lediglich eine korrekte Reklassifizierung in 33 % der Fälle zu erwarten war. Für die einzelnen Cluster wurden mit unterschiedlicher Häufigkeit korrekte Reklassifikationen erzielt: Cluster 1 (Mittelhochreagenten) 40 %, Cluster 2 (Niedrigreagenten) 50 % und Cluster 3 (Hochreagenten) 70 % der Probanden.

Wie schon bei der Analyse der immunfunktionellen Parameter ließ sich der Cluster 3 auch immungenetisch von den beiden

anderen Clustern am deutlichsten unterscheiden.

Die Genkombinationen unseres Patientenkollektivs waren im Mittelhochreagentcluster 1 deutlich häufiger vertreten als in den beiden anderen Kontrollclustern. Das bedeutet, daß die Patienten sowohl immunfunktionell wie auch immungenetisch am ehesten dem Cluster 1 angehören. Die bereits diskutierte Rolle dieses Clusters als Reservoir für autoaggressive Myokarderkrankungen wird durch diesen Befund nochmals unterstrichen.

Die Ergebnisse der verwendeten mathematischen Methoden und der Reklassifikationsanalyse lassen wohl die Hypothese zu, daß das unterschiedliche immunfunktionelle Verhalten gesunder Probanden wenigstens teilweise von einer unterschiedlichen Genzusammensetzung des Haupthistokompatibilitätskomplexes abhängig sein könnte, wobei weniger die vorhandenen Einzelgene als vielmehr bestimmte Kombinationen einen Einfluß auf die lymphozytäre Reaktionsbereitschaft zu besitzen scheinen. Dieser Einfluß dürfte indirekt über die Expression der Genprodukte, also der HLA-Antigene auf der Oberfläche immunkompetenter Zellen wirksam werden (38, 104, 135).

Die HLA-Dr-Gene sind nach unseren Ergebnissen in den immunfunktionell unterschiedlichen Gruppen annähernd gleich verteilt. Diese Gene bzw. ihre Genprodukte dürften somit hinsichtlich der Stärke von Immunreaktionen eine im Vergleich zu den Genen der HLA-A-, HLA-B- und HLA-C-Loci und den Klasse-I-Antigene nur untergeordnete Rolle spielen.

Abschließend muß noch einmal in aller Deutlichkeit darauf hingewiesen werden, daß die zum Teil überraschenden Ergebnisse unserer immungenetischen Untersuchung in der Mehrzahl nicht mit schließenden statistischen Methoden zu sichern waren und unsere diesbezüglichen Überlegungen deshalb als Hypothese zu werten sind.

Gerade diese Unsicherheit sollte jedoch zum Anlaß genommen werden, die Forschungsarbeit auf diesem Gebiet weiterzuführen. Zunächst könnte eine Erweiterung des Kontrollkollektivs auch statistisch signifikante Aussagen über die Verteilung von HLA-Genen innerhalb der ebenfalls zu überprüfenden Cluster gestatten. In der Folge würde die immunfunktionelle und immungenetische Charakterisierung unter Umständen zu einem besseren Verständnis pathogenetischer Zusammenhänge bei verschiedenen, exakt definierten Krankheitsbildern beitragen.

Sollte sich ein ursächlicher Zusammenhang zwischen genetischen Faktoren und der Disposition für bestimmte Erkrankungen nachweisen lassen, so könnten eines Tages Verfahren, die heute bereits unter dem Begriff Genmanipulation im Brennpunkt des Interesses stehen, eine wirkliche Heilungschance für viele Patienten bedeuten.

7. Zusammenfassung

Bei 46 Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und 88 gesunden Probanden wurden lymphozytäre Reaktion auf Stimulation durch Mitogene und Antigene, Suppressorzellaktivität, T-Zellsubpopulationen und HLA-Muster bestimmt.

Die Suppressorzellaktivität der Patientengruppe war statistisch signifikant niedriger als die des Kontrollkollektivs, während die übrigen Parameter keine wesentlichen Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen zeigten.

Im nächsten Schritt der Auswertung wurden alle Daten der Normalprobanden einer Multivarianzanalyse unterzogen. Mit Hilfe dieser Clusteranalyse fanden wir innerhalb des Kontrollkollektivs drei Gruppen von Probanden, die sich hinsichtlich ihrer lymphozytären Reaktion auf mitogene und antigene Stimulation in vitro deutlich voneinander unterschieden. Die Gruppe 1 umfaßte 18 Personen, deren Lymphozyten mittelhoch reagierten, die Gruppe 2 (n = 49) zeigte eine niedrige und die Probanden der Gruppe 3 (n = 21) eine hohe lymphozytäre Reaktion. Dagegen waren keine signifikanten Differenzen in der Suppressorzellaktivität und bei den T-Zellsubpopulationen zwischen den Clustern nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten auf eine funktionelle Ursache für die unterschiedlichen Reaktionsmuster hin.

Alle Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie konnten in der Clusteranalyse der Gruppe 1 zugeordnet werden. Die gesunden Probanden der Gruppe 1, insbesondere jene, die eine niedrige Suppressorzellaktivität aufweisen, könnten somit ein Risikokollektiv für die dilatativen Kardiomyopathien bilden.

In den drei Clustern fanden wir biologisch signifikante Vermehrungen einzelner HLA-Gene sowie von Genkombinationen.

Die Reklassifikation der Probanden in ihre immunfunktionell definierten Cluster gelang anhand ihres HLA-Musters in 40 bis 70 Prozent der Fälle. Auch hinsichtlich der genetischen Parameter war die Patientengruppe dem Cluster 1 des Kontrollkollektivs am ähnlichsten, was als Hinweis auf eine mögliche genetische Determination der lymphozytären Reaktion angesehen werden kann.

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Alper C.A., Rosen F.S.: Genetics of the complement system.
Adv. Human. Genet. 7, 141 - 188 (1976)
2. Amos D.B., Yunis E.J.: A new interpretation of the major histocompatibility gene complexes of man and mouse.
Cell. Immunol. 2, 517 - 520 (1972)
3. Andersson J., Möller G., Sjöberg O.: B-lymphocytes can be stimulated by concanavalin A in the presence of humoral factors released by T-cells.
Eur. J. Immunol. 2, 99 - 101 (1972)
4. Armerding D., Katz D.H., Benacerraf B.: Immune response genes in inbred rats. III Segregation studies of the GT and GA genes and their linkage to the major histocompatibility locus.
Immunogenet. 1, 340 - 351 (1974)
5. Baandrup U., Florio R.A., Roters F., Olson E.G.J.: Electron microscopic investigation of endomyocardial biopsy samples in hypertrophy and cardiomyopathy.
Circulation 63, 1289 - 1298 (1981)
6. Baandrup U., Florio R.A., Roters F., Richardson R.J., Olsen E.G.J.: Critical analysis of endomyocardial biopsies from patients suspected of having cardiomyopathy. II Comparison of histology and clinical/haemodynamic information.
Brit. Heart j. 45: 487 - 493 (1981)
7. Bach F.H., Widmer M.B., Bach M.L., Klein J.: Serologically defined components of the major histocompatibility complex in mouse.
J. Exp. Med. 136, 1430 - 1444 (1972)

8. Bach M.A., Bach J.F.: The use of monoclonal anti-T-cell antibodies to study T cell imbalances in human diseases. Clin. Exp. Immunol. 45, 449 - 456 (1981)
9. Begemann H., Rastetter J., Kaboth W.: Klinische Hämatologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1975)
10. Begemann M.: Das HLA-System des Menschen
Med. Klinik 77, 436 - 445 (1982)
11. Benacerraf B.: Role of the MHC gene products in immune regulation.
Science 212, 1229 - 1238 (1981)
12. Bender K.: Immunglobuline: I Genetik der Antikörperbildung. In: Handbuch der Humangenetik (Becker P.E. ed.) Band I/3, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 223 -243, (1975)
13. Bender K.: Das HLA-System
Biotest, Frankfurt (1983)
14. Bergholtz B.O., Thorsby E.: Macrophage-dependent response of immune human T-lymphocytes to PPD in vitro. Scand. J. Immunol. 6, 779 -786 (1977)
15. Berke G., Amos D.B.: Mechanism of lymphocyte-mediated cytolysis. The LMC cycle and its role in transplantation immunity.
Transplant. Rev. 17, 71 - 107 (1973)
16. Bluestein H.G., Green I., Benacerraf B.: Specific immune response genes of the guinea pig. I Dominant genetic control of immune responsiveness to copolymers of L-glutamic acid and L-alanine and L-glutamic acid and L-

tyrosine.

J. Exp. Med. 134, 458 - 470 (1971)

17. Bolte H.D., SchuttlheiB P.: Immunological results in myocardial diseases.
Postgrad. Med. J. 54, 500 - 503 (1978)
18. Bolte H.D., SchultheiB P., Cyran J., Goss F.: Binding of immunoglobulins in the myocardium (biopsies). In: Myocardial biopsy-diagnostic significance (Bolte H.D. ed.)
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 85 - 96 (1980)
19. Brennink J.R., Doherty P.C.: The response to H-2-different virus-infected cells is mediated by long-lived T lymphocytes and is diminished by prior virus priming in a syngeneic environment.
Cell. Immunol. 61, 220 - 224 (1981)
20. Bresnihan B., Jasin H.E.: Suppressor function of peripheral blood monocular cells in normal individual and in patients with systemic lupus erythematosus.
J. Clin. Invest. 59, 106 - 116 (1977)
21. Brittinger G., König E., Cohnen G., Aberle H.G.: Lysosomale Enzyme in Lymphozyten. I Lymphoretikuläre Erkrankungen: Vergleich des Enzymgehalts (saure Phosphatase, Beta-Glucuronidase) unstimulierter Blutlymphozyten mit der Blastentransformation nach Phytohämagglutinin-Stimulierung in vitro.
Acta Haemat. 44, 205 - 221 (1970)
22. Brittinger G.: Die Lymphozytenkultur als in vitro Modell immunologischer Vorgänge. In: Der Lymphozyt (Pietschmann H. ed.).

Verlag der Wiener Medizinischen Akademie, Wien, 297 - 316 (1972)

23. Broff M.D., Jonsen M.E., Geha R.S.: Nature of the immunogenic moiety recognized by human T cell proliferating in response to tetanus toxoid antigen.
Eur. J. Immunol. 11, 365 - 371 (1981)
24. Brown R.S., Haynes H.A., Foley H.T., Godwin H.A., Berard C.W., Carbone P.P.: Hodgkin's disease. Immunologic, clinical and histologic features of 50 untreated patients.
Ann. Intern. Med. 67, 291 - 302 (1967)
25. Bundschuh., Schneeweiß B.: Immunologie
Akademie Verlag, Berlin (1976)
26. Cantor H., Asofsky R.: Synergy among lymphoid cells mediating the graft-versus-host response. II Synergy in graft-versus-host reactions produced by BALB/c lymphoid cells of differing anatomic origin.
J. Exp. Med. 131, 235 - 246 (1970)
27. Cantor H., Asofsky R.: Paradoxical effects of anti-thymocyte serum on the thymus.
Nature 243, 39 (1973)
28. Croisier P.S., Broom B.C.: Regulation of human cytotoxic lymphocyte responses. II Suppression by a soluble factor produced by primed lymphocytes.
Immunology 43, 19 (1981)
29. Dausset J.: Leuco-agglutinins. IV Leuco-agglutinins and blood transfusion.
Vox sang. 4, 190 - 198 (1954)

30. Dausset J.: Iso-leuco-anticorps.
Acta haemat. 20, 156 - 166 (1958)
31. Dausset J., Hamberger J., Mathe G.: Advances in
transplantation.
Munksgaard, Copenhagen (1966)
32. David J.R.: Lymphocyte mediators and cellular
hypersensitivity.
New Engl. J. Med.: 288, 143 - 149 (1973)
33. Davies A.J.S., Leuchars E., Wallis V., Koller P.C.: The
mitotic response of thymus derived cells to antigenetic
stimulus.
Transplantation 4, 438 - 451 (1966)
34. Day N.K., Good R.A.: Biological amplification systems in
immunology
Plenum Press, New York (1977)
35. De Vita V.T.jr.: Lymphocyte reactivity in Hodgkin's
disease. A lymphocyte civil war.
New Engl. J. Med. 289, 801 - 802 (1973)
36. De Vries R.R.P., Kreeftenberg H.G., Loggen H.G., Rood
J.J. van : In vitro immune responsiveness to vaccinia
virus and HLA.
New Engl. J. Med. 297, 692 - 696 (1977)
37. Dickinson J. (chairman). Debate: The congestive
cardiomyopathy is really hypertensive heart disease in
disguise.
Postgrad. Med. J. 48, 777 - 789 (1972)
38. Dickmeis E., Soeberg B., Svjegaard A.: Human cell-
mediated cytotoxicity against modified target cells is

restricted by HLA.

Nature 270, 526 - 528 (1977)

39. Dorf M.E., Balner H., Benaccerraf B.: Mapping of the immune response genes in the major histocompatibility complex of the rhesus monkey.
J. Exp. Med. 142, 673 - 693 (1975)
40. Dorf M.E., Stimpfling J.H., Benacerraf B.: Requirement for two H-2 complex Ir genes for the immune response to the L-Glu, L-Lys, L-Phe terpolymer.
J. Exp. Med. 141, 1459 - 1463 (1975)
41. Downey H., Mc Kinley C.A.: Acute lymphadenosis compared with acute lymphatic leukemia.
Arch. Intern. Med. 32, 82 - 112 (1923)
42. Dumonde D.C., Wolstencroft R.A., Panayi G.S., Matten M., Morles J., Howson W.T.: "Lymphokines": Non-antibody mediators of cellular immunity generated by lymphocyte activation.
Nature 224, 38 - 42 (1969)
43. Dutton R.W.: Inhibitory and stimulated effects of concanavalin A on the response of mouse spleen cell suspension to antigen.
J. Exp. Med. 136, 1445 - 1460 (1972)
44. Eckstein R.: Die zelluläre Immunität bei chronischer lymphatischer Leukämie und Lymphogranulomatose im Vergleich zu Normalpersonen - eine lymphozytenkinetische Untersuchung.
Inauguraldissertation, München (1978)
45. Eckstein R., Mempel W., Bolte H.D.: Suppressorzellaktivität bei Viruskarditis und kongestiver Kardiomyopathie.

Z. Kardiol. 70, 287 (1981)

46. Eckstein R., Mempel W., Bolte H.D.: Die Bedeutung niedriger Suppressorzellaktivität für die Pathogenese von Myokarditis und kongestiver Kardiomyopathie.

Z. Kardiol. 70, 628 (1981)

47. Eckstein R., Mempel W., Bolte H.D.: Reduced suppressor cell activity in congestive cardiomyopathy and in myocarditis.

Circulation 65, 1224 - 1229 (1982)

48. Eckstein R., Mempel W., Heim M.U., Bolte H.D.: Beziehung zwischen HLA-Genen und niedriger Suppressorzellaktivität bei Patienten mit Myokarditis und kongestiver Kardiomyopathie. In: Forschungsergebnisse der Transfusionsmedizin und Immunhämatologie.

(Nagel V., Stangel W. eds.), Band 8, Medicus Verlag, Berlin, 559 - 566 (1983)

49. Eckstein R., Mempel W., Heim M.U., Bolte H.D.: The role of human leukocyte antigen genes and low suppressor cell activity in the pathogenesis of myocarditis and dilated cardiomyopathy. In: Viral Heart Disease (Bolte H.D. ed.)

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 150 - 161 (1984)

50. Eckstein R., Heim M.U., Huhn D., Schneider B., Müller R., Peltz F., Mempel W.: Cluster of healthy persons with different immune function and their relationship to genes of the major histocompatibility complex.

Abstractbook "18th Congress of the International Society of Blood Transfusion", S. Karger Verlag, Basel, 155 (1984)

51. Eckstein R., Huhn D., Schneider B., Lehmeier A., Heim M.U., Mempel W.: Lymphozytenfunktionsstörungen bei der Histiozytose-X. In: Thymostimulin: Möglichkeiten bei der Behandlung sekundärer Immundefizienzen (Löhr G., Musil J., eds.)
Editio Cantor, Aulendorf, 78 - 87 (1984)
52. Eckstein R., Huhn D., Schneider B., Heim M.U., Peltz F., Müller R., Edlmann M., Löhr G., Mempel W.: Beeinflussung immunfunktioneller Parameter bei Histiozytose-X durch Thymostimulin.
Arzneim. Forschung 35, 155 - 162 (1985)
53. Eckstein R.: Immunologische In-vitro-Untersuchungen bei Gesunden und vier verschiedenen Krankheitsgruppen.
Habilitationsschrift (1985)
54. Ellner J.J., Schachter B.Z., Bhe F.T.: Tuberculin response of lymphocytes from human skintest non reactors; evidence for in vitro primary sensitization of T lymphocytes.
Cell. Immunol. 45, 213 - 220 (1979)
55. Elves M.W.: The lymphocytes.
Lloyd Luke, London (1966)
56. Fink U.: Die Rosettenformation - ein Marker thymusabhängiger Lymphozyten beim Menschen.
Habilitationsschrift, München (1975)
57. Folch H., Waksman B.H.: Regulation of lymphocyte response in vitro. V Suppressor activity of adherent and non-adherent rat lymphoid cells.
Cell. Immunol. 9, 12 - 24 (1973)
58. Forsgren A., Sjöquist J.: "Protein A" from S. aureus. I

Pseudo-immune reaction with human gammaglobulin.

J. Immunol. 97, 822 - 827 (1966)

59. Forsgren A., Svedjelund A., Wigzell H.: Lymphocyte stimulation by protein A of staphylococcus aureus.
Eur. J. Immunol. 6, 207 - 213 (1976)
60. Fowles R.E., Bieber C.P., Stinson E.B.: Defective in vitro suppressor cell function in idiopathic congestive cardiomyopathy.
Circulation 59, 483 - 491 (1979)
61. Francke U., Pellegrino M.A.: Assignment of the major histocompatibility complex to a region of the short arm of human chromosome 6.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 1147 - 1151 (1977)
62. Fu S.M., Winchester R.J., Kunkel H.G.: Occurrence of surface IgM, IgD and free light chains of human lymphocytes.
J. Exp. Med. 139, 451 - 456 (1974)
63. Fudenberg H.H.: Genetically determined immune deficiency as the predisposing cause of "autoimmunity" and lymphoid neoplasia.
Am. J. Med. 51, 295 - 298 (1971)
64. Fudenberg H.H., Stites D.P., Caldwell J.L., Wells J.V. (eds.): Basic and clinical immunology.
Lange Medical Publications, Los Altos, California (1978)
65. Fuster V., Geroh B.J., Giuliani E.R., Tajik A.J., Brandenburg R.O., Frye R.L.: The natural history of idiopathic dilated cardiomyopathy.
Am. J. Cardiol. 47, 525 - 531 (1981)

66. Geha R.S., Schneeberger E., Rosen F.S., Merler E.: Interaction of human thymus - Derived and non-thymus-derived lymphocytes in vitro. Induction of Proliferation and antibody synthesis in B lymphocytes by a soluble factor released from antigen-stimulated T lymphocytes. J. Exp. Med 138, 1230 (1973)
67. Geha R.S., Rosen F.S., Merler E.: Unresponsiveness of human B-lymphocytes to phytohaemagglutinin. Nature 248, 246 - 428 (1974)
68. Geraldles A.: Effects of interferon on cells, viruses and the immune system. Academic Press, New York (1975)
69. Gershon R.K., Kondo K.: Cell interactions in the induction of tolerance: The role of thymic lymphocytes. Immunol. 18, 723 - 738 (1970)
70. Glick B., Chang T.G., Jaap R.G.: The Bursa of Fabricius and antibody production. Poultry Sci. 35, 224 - 225 (1956)
71. Gowen J.W.: Genetic effects in non-specific resistance to infectious disease. Bacteriol. Rev. 24, 192 - 200 (1960)
72. Graziano K.D., Ruckdeschel J.C., Mardiney M.R. jr.: Cell-associated immunity to measles (rubeola). The demonstration of in vitro lymphocyte tritiated thymidine incorporation in response to measles complement fixation antigen. Cell. Immunol. 15, 347 - 359 (1975)
73. Greaves M.F., Hogg N.M.: Immunoglobulin determinants on the surface of antigen binding T- and B-lymphocytes in

- mice. In: Progress in immunology (Amos B. ed.)
Academic Press, New York, 111 - 126 (1971)
74. Greaves M.F., Owen J.J.T., Raff M.C.: T and B lymphocytes.
Excerpta Medica, Amsterdam (1973)
75. Greaves M.F., Janossy G., Doenhoff W.: Activation of human T and B lymphocytes by polyclonal mitogens.
Nature 248, 698 - 701 (1974)
76. Greenberg A.H., Hudson L., Shen L., Roitt I.M.: The identity of cytotoxic cells.
Nature 242, 111 - 113 (1973)
77. Greenberg L.J., Gray E.D., Yunis E.J.: Association of HL-A 5 and immune responsiveness in vitro to streptococcal antigens.
J. Exp. Med. 141, 935 - 943 (1975)
78. Günther E., Rüde E., Stark O.: Antibody response in rats to synthetic polypeptide (T,G)-A-L genetically linked to the major histocompatibility system.
J. Immunol. 2, 151 - 155 (1972)
79. Hapel A.J., Bablanian R., Cole G.A.: Inductive requirements for the generation of virus-specific T lymphocytes. I The nature of the host-cell-virus interaction that triggers secondary poxvirus-specific cytotoxic T lymphocyte induction.
J. Immunol. 121, 736 - 743 (1978)
80. Havemann K., Schmidt M.: Lymphozytenkulturen bei Hodgkinscher Erkrankung. Hinweise für zwei Lymphozytenpopulationen bei unterschiedlicher Reaktion auf Phytohämagglutinin.

Klin. Wochenschrift 46, 31 - 33 (1968)

81. Herbermann R.B.: Lymphoid cells in immune surveillance against malignant transformation. In: Advances in Host Defense Mechanismus (Gallin J.I., Fauci A.S. eds.) Volume 2, Raven Press, New York, 241 - 273 (1983)
82. Hodgson H.J.F., Wands J.R., Isselbacher K.J.: Alteration in suppressor cell activity in chronic active hepatitis. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75, 1549 - 1553 (1978)
83. Hood L., Prahl J.W.: The immune system: a model for differentiation in higher organisms. Adv. Immunol. 14, 291 - 351 (1971)
84. Huber C.H., Michlmayr G., Falkensammer M., Fink U., zur Nedden G., Braunsteiner H., Huber H.: Increased proliferation of T-lymphocytes in the blood of patients with Hodgkin's disease. Clin. Exp. Immunol. 21, 47 - 53 (1975)
85. Huber H., Pathouli C.H., Michlmayr G.: Immunpathologie lymphatischer Systemerkrankungen. In: Lymphozyt und klinischen Immunologie (Theml H., Begemann H eds.) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 96 - 111, (1975)
86. Huber S.A., Lyden D.C., Lodge P.A.: Immunopathogenesis of experimental Cocksackievirus induced myokarditis: Role of autoimmunity. Herz 10, 1 - 7 (1985)
87. Humphrey J.H., White R.G.: Immunology of students of medicine. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1970)

88. Hungerford D.A., Donnelly A.J., Nowell P.C., Beck S.: The chromosome constitution of a human phenotypic intersex. *Am. J. Human Genetics* 11, 215 - 236 (1959)
89. Ivani K., Murgatroyd L.B., Lydyard P.M.: Bursal origin of bone marrow cells with competence for antibody formation. *Immunology* 23, 107 - 111 (1972)
90. Jemsem K.: Investigations of staphylococcal antigen structure, with special reference to a polysaccharide antigen and normally-present antibodies against this antigen. Thesis, Munksgaard, Copenhagen (1959)
91. Johnson R.A., Palcios I.: Dilated cardiomyopathies of the adult (First of two parts). *New Engl. J. Med.* 307, 1051 - 1058 (1982)
92. Kantor F.S., Ojeda A., Benacerraf B.: Studies on artificial antigens. I Antigenicity of DNP-polylysine and DNP-copolymer of lysine and glutamic acid in guinea pigs. *J. Exp. Med.* 117, 55 - 70 (1963)
93. Kato S., Muranaka S., Takakura S., Kimura M., Tsuji K.: HLA-Dr antigens and the rubella-specific immune response in man. *Tissue Antigens* 19, 140 - 145 (1982)
94. Katz D.H., Benacerraf B.: The regulatory influence of activated T cells on B cells responses to antigen. *Adv. Immunol.* 15, 2 (1972)
95. Katz D.H., Hamaoka T., Benacerraf B.: Cell interactions between histoin-compatible T and B lymphocytes. II:

Failure of Physiologic cooperative interactions between T and B lymphocytes from allogeneic donor strains in humoral response to hapten-protein conjugates.

J. Exp. Med. 137, 1405 (1973)

96. Katz D.H., Greaves M., Dorf M.E., Dimuzio H., Benacerraf B.: Cell interactions between histoincompatible T and B lymphocytes. VII Cooperative response between lymphocytes are controlled by genes in the I region of the H-2 complex.

J. Exp. Med. 141, 263 (1975)

97. Keller R.: Immunologie und Immunpathologie
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1981)

98. Kilbourne E.D., Wilson C.B., Perrier D.: The induction of gross myocardial lesions by a Cocksackie (Pleurodynia) virus and cortisone.

J. Clin. Invest. 35, 362 - 370 (1956)

- 99.. Kincade P.W., Self K.S., Cooper M.D.: Survival and function of Bursa-derived cells in bursectomized chickens.

Cell. Immunol. 8, 93 - 102 (1973)

100. Kipshidze N.N.: Some problems of etiology and pathogenesis of cardiomyopathies.

Wiss. Symposium Kardiomyopathie, Jena, 18 (1983)

101. Kishimoto C.H., Tomioka N., Kawai C.H.: Clinical findings in acute viral myocarditis.

Herz 10, 15 - 20 (1985)

102. Kissmeyer-Nielsen F., Kjerbye E.: Lymphocytotoxic microtechnique. Purification of lymphocytes by flotation.

Histocompatibility Testing 1967. Munksgaard, Kopenhagen, 381 - 383 (1967)

103. Klein J., Park J.M.: Graft versus host reaction across different regions of the H-2 complex of the mouse.
J. Exp. Med. 136, 1430 (1972)
104. Klein J.: Evolution and function of the major histocompatibility system: facts and speculations.
In: The Major Histocompatibility System in Man and Animals (Götze D. ed.)
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 339 - 378 (1977)
105. Kline I.K., Saphir O.: Chronic pernicious myocarditis.
Am. Heart J. 59, 681 - 697 (1960)
106. Koszinowski U., Ertl H.: Lysis mediated by T cells and restricted by H-2 antigen of target cells infected with vaccinia virus.
Nature 255, 552 - 554 (1975)
107. Kratzin H., Yang C., Götz H., Pauly E., Kölbel S., Egert G., Thinnies F.P., Wernet P., Altevogt P., Hilschmann N.: Primärstruktur menschlicher Histokompatibilitätsantigene der Klasse II: 1. Mitteilung: Aminosäuresequenz der N-terminalen 198 Reste der Beta-Kette des HLA-Dw 2,2; Dr 2,2-Alloantigens.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chemie 362, 1665 - 1669 (1981)
108. Kuhn H.: Differentialdiagnostische Abgrenzung von entzündlichen Herzmuskelerkrankungen.
Internist 25, 165 - 172 (1984)

109. Kung B.C., Goldstein G., Reinherz E.L., Schlossmann S.F.: Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens.
Science 206, 347 - 349 (1979)
110. Lachmann P.J.: Lymphocyte cooperation
Proc. Roy. Soc. Band 176, London, 425 - 426 (1971)
111. Lamm L.U., Svejgaard A., Kissmeyer-Nielsen F.: PHM₃:
HLA is another linkage in man.
Nature (New Biology) 231, 109 - 110 (1971)
112. Landsteiner K.: Über Agglutinationserscheinungen
normaler menschlicher Blute.
Wien. klin. Wochenschr. 14, 1132 - 1134 (1901)
113. Langmann J.: Medizinische Embryologie
Georg Thieme Verlag, (1977)
114. Lin S.P., Cooper A.G., Wortis H.H.: Scanning electronic
microscopy of human T cell and B cell rosettes.
New Engl. J. Med. 289, 548 - 551 (1973)
115. Loor F., Roelants G.E.: B and T cells in immune
recognition.
John Wiley & Sons, Chichester (1977)
116. Lurie M.B.: Resistance to tuberculosis.
Harvard Iniversity Press, Cambridge (1964)
117. Macdonald T.T.: Immunosuppression caused by antigen
feeding. II Suppressor cells mark Peyer's patch B-cell
priming to orally administred antigen.
Eur. J. Immunol. 13, 138 - 142 (1983)
118. Maisch B., Bülowius U., Schmier K., Klopff D., Koper D.,

Sibelis T.H., Kochsiek: Immunological cellular regulator and effector mechanisms in myocarditis.
Herz 10, 8 - 14 (1985)

119. Martin W.J., Maurer P.H., Benacerraf B.: Genetic control of immune responsiveness to a glutamine acid, alanine, tyrosine copolymer in mice. I Linkage of responsiveness to H-2 genotype.
J. Immunol. 107, 715 - 718 (1971)
120. Matchett K.M., Huang A.T., Kremer W.B.: Impaired lymphocyte transformation in Hodgkin's disease. Evidence for depletion of circulating T-lymphocytes.
J. Clin. Invest. 52, 1908 - 1917 (1973)
121. Mayr W.R., Bissbort S., Kömpf J.: Confirmation of the linkage HL-A/PGM₃
Humangenetik 28, 173 - 174 (1975)
122. Mc Michael A., Sasazuki T., Mc Devitt H.O.: The immune response to diphtheria toxoid in humans.
Transplantation Proc. 9, 191 - 194 (1977)
123. Medawar P.B.: Immunity to homologous grafted skin. II The relationship between the antigens of blood and skin.
Brit. J. Exp. Path. 27, 15 -24 (1946)
124. Medawar P.B., Simpson.: Thymus-dependent lymphocytes.
Nature 258, 106 - 108 (1975)
125. Mempel W., Albert F., Burger A.: Further evidence for a separate MLC-locus.
Tissue Antigens 2, 250 - 254 (1972)
126. Mempel W., Grosse-Wilde H., Baumann P., Netzel B.,

Steinbauer-Rosenthal I., Scholz S., Bertram J., Albert E.: Population genetics of the MLC-response: Typing for MLC determinants using homozygous and heterozygous reference cells.

Transplant. Proc. 5, 1529 - 1538 (1973)

127. Mempel W., Grosse-Wilde H., Albert E., Thierfelder S.: Atypical MLC reactions in HLA typed related and unrelated pairs.

Transplant. Proc. 5, 401 - 408 (1973)

128. Merryman C.F., Maurer P.H., Stimpfling J.H.: Unigenic and multigenic I region control of the immune responses of mice to the GAT¹⁰ and Gl 0-GLT terpolymer.

Immunogenetics 2, 441 (1975)

129. Miller C., Trunkey D.: Immunobiology of sepsis In: Surgical Infections (Flint L.M., Fry D.E. eds.)

Medical Examination Publ. Comp., New York, 8 - 24 (1982)

130. Mizerski J., Chartrand S., Gajlpeczalska K.: Con-A-induced suppressor cells in man. I Induction and characterization of suppressor cells.

Immunobiol. 158, 270 - 281 (1981)

131. Möller G., Svehag S.E.: Specificity of lymphocyte-mediated cytotoxicity induced by in vitro antibody-coated target cells.

Cell. Immunol. 4, 1 - 9 (1972)

132. Möller G., Landwall P.: The polyclonal B-cell-activating property of protein A is not due to its interaction with the Fc part of immunoglobulin receptors.

Scand. J. Immunol. 6, 357 - 366 (1977)

133. Munro A.J., Tausig M.J.: Two genes in the major histocompatibility complex and their relationship to the immune response.
Nature 256, 103 - 106 (1975)
134. Munro A., Bright S.: Products of the major histocompatibility complex and their relationship to the immune response.
Nature 264, 145 - 152 (1976)
135. Munro A., Waldmann H.: Major histocompatibility system and immune response.
Brit. Med. Bull. 34, 253 - 258 (1978)
136. Nelson D.S.: Macrophages and Immunity.
North Holland Publ., Amsterdam (1968)
137. Nowell P.C.: Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes.
Cancer Res. 20, 462 - 467 (1960)
138. Oie M., Tchihashi Y.: Target antigen of vaccinia-infected cells recognized by virus-specific cytotoxic T lymphocytes.
Microbiol. Immunol. 25, 361 - 375 (1981)
139. Olsen E.G.J.: The pathology of cardiomyopathies: a critical analysis.
Am. Heart J. 98, 385 - 392 (1979)
140. Olsen E.G.J.: The role of biopsy in the diagnosis of myocarditis.
Herz 10, 21 - 25 (1985)
141. Osler A.C.: Complement: Mechanisms and functions.
Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New York (1976)

142. Owen J.J.T., Ritter M.A.: Tissue interaction in the development of thymuslymphocytes.
J. Exp. Med. 129, 431 - 442 (1969)
143. Pappenheim A.: Panoptische Universalfärbung für Blutpräparate
Med. Klin. 32, 1244 (1908)
144. Parkhouse R.M.E., Abney E.R.: Heterogeneity of surface immunoglobulin on murine B-lymphocytes. In: Membrane Receptors of Lymphocytes (Seligmann M., Preud'homme J.L., Kourilsky F.M. eds.)
North Holland Publ., Amsterdam, 51 - 64 (1975)
145. Pasquier L. du: Phylogenesis of the vertebrate immune system. In: The immune system (Melchers F., Rajewski K., eds.)
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 101 - 115, (1977)
146. Peavy D.L., Pierce C.W.: Cell mediated immune responses in vitro. I Suppression of the generation of cytotoxic lymphocytes by concanavalin A and concanavalin A-activated spleen cells.
J. Exp. Med. 140, 356 - 369 (1974)
147. Pellegrino M.A., Ferrone S., Safford J.W. jr., Hirata A.A., Terasaki P.I., Reisfeld R.A.: Stimulation of lymphocyte transformation by streptococcal type M 1 protein: relationship to HL-A antigens.
J. Immunol. 109, 97 - 109 (1972)
148. Penn I.: Depressed immunity and the development of cancer.
Clin. Exp. Immunol. 46, 459 - 474 (1981)

149. Perlmann P., Nilsson H., Leon M.A.: Inhibition of cytotoxicity of lymphocytes by concanavalin A in vitro. Science 168, 1112 - 1115 (1970)

150. Pernis B.: The effect of anti-IgD-antiserum on antibody production in rhesus monkeys. In: Membrane Receptors of Lymphocytes (Seligmann M., Preud'homme J.L., Kourilsky F.M. eds.). North Holland Publ., Amsterdam, 25 - 26, (1975)

151. Peter H.H.: The origin of human NK cells. An ontogenetic model derived from studies in patients with immunodeficiencies. Blut 46, 239 - 248 (1983)

152. Pettenkofer H.J., Maasen W., Bickerich R.: Antigengemeinschaften zwischen menschlichen Blutgruppen und Enterobacteriaceen. Z. Immunforsch. 119, 415 - 429 (1960)

153. Piguet P.F., Vasalli P.: Study of the thymic-derived or -independent nature of mouse spleen cells induced to proliferate in culture by various mitogens and antigens. Eur. J. Immunol. 3, 477 - 483 (1973)

154. Playfair J.H.L., Purves E.C.: Separate thymus dependent and thymus independent antibody forming cell precursors. Nature 231, 149 - 151 (1971)

155. Polliak A., Lampen N., Clarkson B.D., De Harven E., Bentwich Z., Kinkel H.G.: Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy. J. Exp. Med. 138, 607 624 (1973)

156. Raff M.C., Cantor H.: Subpopulations of thymus cells and thymus-derived lymphocytes. In: Progress in Immunology (Amos B. ed.) Academic Press, New York, 83 - 93 (1971)
157. Reinherz E.L., Moretta L., Roper M., Breard J.M., Mingari M.C., Cooper M.D., Schlossmann S.F.: Human T-lymphocytes subpopulations defined by Fc receptors and monoclonal antibodies. A comparison. J. Exp. Med. 151, 969 - 974 (1980)
158. Reinherz E.L., Schlossmann S.F.: The differentiation and function of human T lymphocytes. Cell 19, 821 - 827 (1980)
159. Rich R.R., Pierce C.W.: Biological expressions of lymphocyte activation. I Effects of phytomitogens on antibody synthesis in vitro. J. Exp. Med. 137, 205 (1973)
160. Rich R.R., Pierce C.W.: Biological expression of lymphocyte activation. II Generation of a population of thymus-derived suppressor lymphocytes. J. Exp. Med. 137, 649 - 659 (1973)
161. Rich R.R., Rich S.: Biological expression of lymphocyte activation: IV Concanavalin A-activated suppressor cells in mouse mixed lymphocyte reactions. J. Immunol. 114, 1112 - 1114 (1975)
162. Richardson P.J.: King's endomyocardial biotome. Lancet 1, 660 (1974)
163. Richardson P.J.: Immunosuppressive therapy in the management of biopsy proven acute myocarditis. Herz 10, 36 - 43 (1985)

164. Rosen F.S.: Complement: Ontogeny and phylogeny.
Transplant. Proc. 6, 47 - 50 (1974)
165. Rowley D.: Phagocytosis.
Adv. Immunol. 2, 241 - 264 (1962)
166. Rubin A.D., Johnson L.I., Brown S.M.: Lymphocyte proliferation and lymphoproliferative disorders.
Progr. Exp. Tumor Res. 13, 135 - 180 (1970)
167. Ruckdeschel J.C., Graziano K.D., Mardiney M.R. jr.: Additional evidence that the cell-associated immune system is the primary host defense against measles (rubeola).
Cell Immunol. 17, 11 - 18 (1975)
168. Rustad R.C.: Pinocytosis
Sci. Amer. 204, 120 - 130 (1961)
169. Salton M.R.J.: The properties of lysozyme and its action on microorganisms.
Bacteriol. Rev. 21, 82 - 99 (1957)
170. Sasazuki T., Kohno Y., Iwamoto T., Tanimura N.: Association between an HLA haplotype and low responsiveness to tetanus toxoid in man.
Nature 272, 359 - 361 (1978)
171. Schellekens P.T.A., Vriesendorp B., Eijssvoogel V.P., Leeuwen A. van, Rood J.J. van, Miggianis V., Ceppellini R.: Lymphocyte transformation in vitro. II Mixed lymphocyte culture in relation to leukocyte antigens.
Clin. Exp. Immunol. 6, 241 - 254 (1970)
172. Schellekens P.T.A., Eijssvoogel V.P.: Lymphocyte transformation in vitro. III Mechanism of stimulation

in the mixed lymphocyte culture.

Clin. Exp. Immunol. 7, 229 - 239 (1970)

173. Schlesinger M.: Anti-theta-antibodies for detecting thymus dependent lymphocytes in the immune response of mice to SRBC.
Nature 226, 1245 - 1256 (1970)
174. Schmid J.R., Oechsli R.J.: Mononucleosis infectiosa. Eine autoradiographische Studie der DNS- und RNS-Synthese in vitro.
Schweiz. med. Wochenschr. 94, 1395 - 1397 (1964)
175. Schulte Wissermann H., Gardilic S.: Die Rolle des Thymus in der Entwicklung der Immunkompetenz.
Monatsschrift Kinderheilkunde 129, 378 - 390 (1981)
176. Sell S.: Immunologie, Immunpathologie und Immunität.
Verlag Chemie, Weinheim, New York, 198 (1977)
177. Sengar D.P.S., Mickey M.R., Myhre B.A., Chen H.H., Terasaki P.I.: Mixed leukocyte culture response in HLA "identical individuals".
Transfusion 11, 251 - 257 (1971)
178. Shackelford D.A., Kaufmann J.F., Korman A.J., Strominger D.L.: HLA-Dr-antigens: Structure, separation of subpopulations, gene cloning and function.
Immunol. Rev. 66, 133 - 187 (1982)
179. Shou L., Schwartz S.A., Good R.A.: Suppressor cell activity after concanavalin A treatment of lymphocytes from normal donors.
J. Exp. Med. 143, 1100 - 1110 (1976)
180. Simpson E., Cantor H.: Regulation of the immune

response by subclasses of T lymphocytes. II The effect of adult thymectomy upon humoral and cellular responses in mice.

Eur. J. Immunol. 1, 337 - 343 (1975)

181. Skarnes A.C., Watson D.W.: Antimicrobial factors of normal tissues and fluids.
Bacteriol. Rev. 21, 273 - 294 (1957)
182. Smith K.A., Chess L., Mardiney M.R. jr.: The relationship between rubella hemagglutinin inhibition antibody (HIA) and rubella induced in vitro lymphocyte tritiated thymidine incorporation.
Cel. Immunol. 8, 321 - 327 (1973)
183. Smith R.T., Miescher P.A., Good R.A. eds.: Phylogeny of Immunity
Univ. of Florida Press (1966)
184. Snary D., Barnstable C., Bodmer W.F., Goodfellow P., Crumpton M.J.: Human Ia antigens - purification and molecular structure.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 41, 379 - 386 (1977)
185. Solbach W., Röllinghoff M., Wagner H.: Die Rolle von Interleukin-2 bei der Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten.
Klin. Wochenschrift 661, 67 - 75 (1983)
186. Someren H. van, Westerveld A., Hagemeijer H., Mees J.R., Meera Khan P., Zaalberg O.B.: Human antigen and enzyme marker in man - Chinese hamster somatic cell hybrids: Evidence for syntenry between the HL-A, PGM₃, ME and IPO-B loci.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 962 - 965 (1974)

187. Sprent J.: Migration and lifespan of lymphocytes. In:
B and T cells in immune recognition (Loor F., Roelants
G.E. eds.)
John Wiley & Sons, Chichester, 59 - 82 (1977)
188. Stobo J.D., Paul W.E.: Functional heterogeneity of
murine lymphoid cells. III Differential responsiveness
of T cells to phytohemagglutinin and concanavalin A as
probe for T cell subsets.
J. Immunol. 110, 362 - 375 (1973)
189. Strober S.: Immune function, cell surface
characteristics and maturation of B cell
subpopulations.
Transplant. Rev. 24, 84 - 112 (1975)
190. Taussig M.J.: T cell factor which can replace T cells
in vitro.
Nature 248, 234 (1974)
191. Temple A., Loewi G., Davies P., Howard A.: Cytotoxicity
of immune guinea-pig cells. II The mechanism of
macrophage cytotoxicity.
Immunology 24, 655 - 699 (1973)
192. Terasaki P.I., McClelland J.D.: Microdroplet assay of
human serum cytotoxins.
Nature 204, 998 - 1000 (1964)
193. Thorbecke G.J., Benacerraf B.: The reticulo-endothelial
system and immunological phenomena.
Progr. Allergy 6, 559 - 598 (1962)
194. Thomar R.H., Taylor F.B. jr., Green G.R.: Delayed
hypersensitivity to SK-SD: in vitro lymphocyte study
with an active component.

J. Immunol. 108, 231 - 235 (1972)

195. Treves A.J., Tal T., Break V., Fuks Z.: Antigen presentation and regulating functions of human monocytes in the in vitro response of lymphocytes against purified protein derivative of tuberculin (PPD).
Eur. J. Immunol. 11, 487 - 492 (1981)
196. Unanue E.R., Grey H.H., Rabellino E., Campbell P., Schmidtke J.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. The bone marrow as the main source of lymphocytes with detectable surface bound immunoglobulins.
J. Exp. Med. 133, 1188 - 1198 (1971)
197. Valdimarrson H., Agnarsdottir G., Lachmann P.J.: Measles virus receptor on human T-lymphocytes.
Nature 255, 554 - 556 (1975)
198. Vitetta E.S., Uhr J.W.: IgD on murine lymphocytes: Implications for differentiation and stimulation of B lymphocytes. In: Membrane Receptors of Lymphocytes (Seligmann M., Preud'homme J.L., Kourilsky F.M. eds.). North Holland Publ., Amsterdam, 27 - 37 (1975)
199. Vossen J.M., Hijmanns W.: Membrane-associated immunoglobulin determinants on bone marrow and blood lymphocytes in the pediatric age group and on fetal tissues.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 254, 262 - 279 (1975)
200. Waldmann H., Munro A.: T-cell dependent mediator in the immune response.
Nature 243, 356 - 357 (1973)
201. Watson J., Epstein R., Nakoinz I., Ralph P.: The role

of humoral factors in the initiation of in vitro primary immune responses: effects of lymphocyte mitogens.

J. Immunol. 110, 43 - 52 (1973)

202. Webb D.R.: Studies on the non-specific regulation of immunocomponent cell function. In: Immunopharmacology and the regulation of leukocyte function (Webb D.R. ed.)

Marcel Dekker, New York, Volume 19, 143 - 158 (1982)

203. Wedgwood R.G.: Properdin In: Immunological Methods (Achroyd J.F. von, ed.)

Blackwell Scientific Publications, Oxford, 25 - 42 (1964)

204. Wernet P.: Human Ia-type alloantigens: methods of detection, aspects of chemistry and biology, markers for disease states.

Transplant. Rev. 30, 271 - 298 (1976)

205. Williams M., Benacerraf B.: Genetic control of thymus derived cell function. I In vitro DNA synthesis response of normal mouse spleen cells stimulated by the mitogens concanavalin A and phytohemagglutinin.

J. Exp. Med. 135, 1279 - 1292 (1972)

206. Wolstencroft R.A., Mathew M., Oates C., Maini R.M., Dumonde D.C.: Lymphocyte mitogenic factor in all mediated immunity. In: The Role of Lymphocytes and Macrophages in the Immunological Response (Dumonde D.C.)

Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 28 - 37 (1971)

207. Wood T.A., Frenkel E.P.: The atypical lymphocyte.

Am. J. Med. 42, 923 -936 (1967)

208. Wood W.B.: Phagocytosis with particular reference to encapsulated bacteria.
Bacteriol. Rev. 24, 41 - 49 (1960)
209. Woodruff J.F., Kilbourne E.D.: The influence of quantitated post-weaning undernutrition on Coxsackie B-3 infection of adult mice. I Viral persistence and increased severity of lesions.
J. Infect. Dis. 121, 137 - 163 (1970)
210. Woodruff J.F.: Viral myocarditis
Am. J. Pathol. 101, 425 - 479 (1980)
211. Yang C., Kratzin H., Götz H., Thinnes F.P., Kruse T., Egert G., Pauly E., Kölbel S., Wernet P., Hilschmann N.: Primärstruktur der Klasse-II-Antigene: 2.Mitteilung: Aminosäuresequenz der N-terminalen 179 Reste der Alpha-Kette des HLA-Dw 2,2; Dr 2,2-Alloantigens.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363, 671 - 676 (1982)
212. Yunis E.J., Amos B.D.: Three closely linked genetic systems relevant to transplantation.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 3031 - 3035 (1971)
213. Zaleski M., Milgrom F.: Complementary genes controlling immune response to O-AKR in mice.
J. Immunol. 110, 1238 - 1244 (1973)
214. Zee-Cheng C.S., Tsai C.C., Palmer D.C, Codd J.E., Penington G., Williams G.A.: High incidence of myocarditis by endomyocardial biopsy in patients with idiopathic congestive cardiomyopathy.
J. Am. Clin. Cardiol. 3, 63 - 70 (1984)

215. Zweimann B.: In vitro effects of measles virus on proliferating human lymphocytes.

J. Immunol. 106, 1154 - 158 (1971)

Herrn Professor Dr. W. Mempel danke ich für die Überlassung des Themas und für die Möglichkeit, die Einrichtungen des Transfusionszentrums der Medizinischen Klinik III/Klinikum Großhadern zu benutzen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Reinhold Eckstein von der Medizinischen Klinik III/Klinikum Großhadern der Universität München für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Experimente. Durch seine stets freundliche Diskussionsbereitschaft lieferte er mir wesentliche Denkanstöße, die entscheidend zur Erstellung des Gesamtkonzepts und zum schließlichen Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Für die hervorragende mathematische Beratung bei der Analyse der Versuchsdaten danke ich Herrn Professor Dr. B. Schneider vom Institut für Biometrie der Medizinischen Hochschule Hannover.

Herrn Professor Dr. H.D. Bolte von der Medizinischen Klinik I/Klinikum Großhadern danke ich für die Überlassung des Patientenkollektivs.

Für die Unterstützung bei den medizinisch-technischen Untersuchungen danke ich insbesondere den Mitarbeiterinnen des Transfusionszentrums der Medizinischen Klinik III/Klinikum Großhadern, Angela Lehmeier, Ursula Mangold und Annette Schleifer.

LEBENS LAUF

Name: Müller
Vornamen: Richard Adolf
geboren am: 19. Juni 1954
Geburtsort: Waldstadt
Eltern: Richard Josef Müller
Margit Müller, geb. Kocourek
Schulausbildung: 1960 - 1966 Volksschule in Waldstadt,
Kirchham und Geretsried
1966 - 1970 Realschule Wolfratshausen
1970/71 Übergangsklasse
1971 - 1974 Dante-Gymnasium München
Wehrdienst: 1975 - 1979 beim Fernmeldebataillon 220
in Donauwörth
Studium: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-
Maximilians-Universität in München 1979
- 1985: Ärztliche Vorprüfung 1981,
I.Staatsexamen 1982, II.Staatsexamen
1984, III.Staatsexamen 1985.
Approbation: am 26. Juli 1985
Promotionssemester: seit 26. Juli 1985

